



**Bruno Miguel Carriço Valente**

Licenciado em Engenharia Mecânica

(Escola Superior de Tecnologias-Instituto Politécnico de Setúbal)

## **Solução integrada para o tratamento de resíduos e efluentes com elevado teor de carbono orgânico e contaminação microbiológica**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
Engenharia de Energias Renováveis

Orientador: Maria Margarida Gonçalves, Professora Auxiliar da Faculdade de  
Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

Co-orientador: Pedro Pereira, Professor Auxiliar da Faculdade de Ciências e  
Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

Júri:

Presidente: Prof. Doutor João Francisco Alves Martins

Arguente: Doutor Eduardo Manuel Hipólito Pires Mateus

Vogal: Prof. Doutora Maria Margarida Boavida Pontes Gonçalves



FACULDADE DE  
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

**Setembro 2018**



Bruno Miguel Carriço Valente

Licenciado em Engenharia Mecânica

# **Solução integrada para o tratamento de resíduos e efluentes com elevado teor de carbono orgânico e contaminação microbiológica**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
Engenharia de Energias Renováveis

Orientador: Maria Margarida Gonçalves, Professora Auxiliar da Faculdade de  
Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

Co-orientador: Pedro Pereira, Professor Auxiliar da Faculdade de Ciências e  
Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

Setembro 2018



# Copyright

**“Solução integrada para o tratamento de resíduos e efluentes com elevado teor de carbono orgânico e contaminação microbiológica”**

Copyright © Bruno Miguel Carriço Valente, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.



# Agradecimentos

A presente dissertação não teria sido possível sem o contributo e o apoio de um conjunto de pessoas a quem passo a expressar o meu profundo agradecimento:

À Professora Doutora Margarida Gonçalves por toda a disponibilidade, paciência, confiança e motivação dada ao longo deste ano.

À Verónica Lee por todo o apoio demonstrado ao longo dos meses em que fomos colegas, sem ti tudo tinha sido mais difícil.

À Catarina Nobre, por estar sempre disponível para ajudar e esclarecer qualquer dúvida e pelos conselhos fornecidos, agora vejo que tinhas razão.

À Catarina Viegas por todo o apoio fornecido ao longo dos meses de laboratório.

Ao Ricardo Correia, que foi incansável no apoio fornecido, principalmente na última etapa. Não sei como te agradecer a ajuda que me deste em “tempos de crise”.

Ao Professor Doutor Pedro Pereira, pelo apoio, ao longo destes meses.

Ao Professor Doutor Mário Ventim Neves, coordenador do Mestrado de Engenharia das Energias Renováveis pela presença e apoio ao longo do mestrado.

À Avibom, Resitejo e Prelis pelo material fornecido para a realização deste trabalho.

Aos meus amigos por perceberem o meu isolamento nesta fase da minha vida e por estarem sempre lá, quando é preciso.

Aos meus pais, pelo sacrifício que é ter dois filhos na faculdade ao mesmo tempo e por todas as vezes que me tentaram pôr juízo.

À minha namorada, por aturar o meu mau humor e sempre me apoiar em todas as decisões que eu tomo.





# Resumo

O tratamento de resíduos com elevado teor de compostos orgânicos biodegradáveis, elevado teor de água e elevado teor de contaminação microbiológica, representa um problema importante do ponto de vista ambiental e económico pois envolvem custos consideráveis para as entidades produtoras e têm associadas emissões gasosas e líquidas consideráveis. Exemplos deste tipo de resíduos são as lamas de ETAR, os estrumes resultantes das atividades de produção animal, ou os efluentes resultantes do abate de animais para alimentação, para os quais não se encontraram ainda soluções de valorização e tratamento que permitam processar rapidamente as quantidades produzidas e que apresentem baixo impacto ambiental.

Neste trabalho pretende-se desenvolver uma solução integrada para tratamento deste tipo de resíduos escolhendo como casos de estudo Fração Orgânica dos Resíduos Sólidos Urbanos, estrumes de bovino e efluente de aviário usando a microalga *Chlorella Vulgaris* e valorização da biomassa algal obtida.

O uso da Fração Orgânica dos Resíduos Sólidos Urbanos como fonte de nutrientes para o crescimento da microalga *Chlorella Vulgaris* não foi eficiente, tendo as culturas acabado por morrer, no entanto foram atingidas taxas de remoção de 49%, 43,1%, 99-100% e 28,6-56,9% para o Fósforo Total, CQO, CBO<sub>5</sub> e Azoto Kjeldahl, respetivamente. No entanto a descarga deste efluente tratado em meio hídrico natural não seria possível.

O uso de quantidades excessivas de cinzas de biomassa utilizadas no pré-tratamento de efluentes de estrume de bovinocultura, revelaram-se como um fator de adição de toxicidade ao meio. Como forma de avaliar quais as variáveis que influenciam a densidade ótica, a massa de precipitado, o volume de filtrado e os sólidos suspensos totais utilizou-se o software Design Expert version 11.

A utilização do efluente de Aviário, em regime descontínuo e semi-contínuo, permitiu o crescimento da cultura de *Chlorella vulgaris* tendo-se atingido uma produção algal de 0,57-2,32 g/L.

Após a bioremediação do efluente de aviário, a descarga deste, em meio hídrico natural, não seria possível, no entanto, os valores obtidos encontram-se próximos dos de descarga. A biomassa produzida pode ser valorizada como ração animal numa abordagem de Economia Circular.

**Palavras-chave:** Microalgas, compostos orgânicos, pré-tratamento, cinzas de biomassa, efluentes, biorremediação



# Abstract

The treatment of wastes with a high content of biodegradable organic compounds, high water content and high microbiological contamination, represents an important environmental and economic problem since it involves considerable costs for the producing entities and has associated considerable gaseous and liquid emissions. Examples of this type of waste are sewage sludge, manure resulting from animal production activities, or effluent resulting from the slaughter of animals for feeding, for which no recovery and treatment solutions have been found to allow rapid processing of the quantities produced, while having a low environmental impact.

This work intended to develop an integrated solution for the treatment of this type of waste, choosing as Organic Fraction of Urban Solid Waste, bovine manure and aviary effluent using the *Chlorella vulgaris* and valorization of the obtained algal biomass.

The use of the Organic Fraction of Urban Solid Waste as a source of nutrients for the growth of the microalga *Chlorella vulgaris* was not efficient, with the crops finished to die, however removal rates of 49%, 43.1%, 99-100 % and 28.6-56.9% for Total Phosphorus, COD, BOD and Total Nitrogen, respectively. However the discharge of this treated effluent into natural water medium would not be possible.

The use of excessive amounts of biomass ash used in the pre-treatment of cattle manure effluents proved to be a toxicity addition factor in the medium. As a way of evaluating the variables that influence optical density, precipitate mass, filtrate volume and total suspended solids, the software Design Expert version 11 was used.

The use of the aviary effluent, in a discontinuous and semi-continuous regime, allowed the growth of the *Chlorella vulgaris* culture, reaching a biomass production of 0.57-2.32 g/L. After the bioremediation of the aviary effluent, its discharge in a natural water medium would not be possible however, the values obtained are close to those of discharge. The biomass produced can be valued as animal feed in a Circular Economy approach.

**Keywords:** Microalgae, organic compounds, pre-treatment, biomass ash, effluents, bioremediation



# Índice

Copyright .....	v
Agradecimentos .....	vii
Resumo .....	ix
Abstract .....	xi
Índice de Figuras.....	xvi
Índice de Tabelas .....	xviii
Lista de abreviaturas .....	xxi
Objetivos .....	1
1-Introdução.....	2
1.1- Enquadramento legislativo .....	2
1.2- Valorização energética a partir de resíduos.....	3
1.3-Microalgas.....	4
1.4- Economia circular.....	8
2- Valorização da fração orgânica de resíduos sólidos urbanos e estrumes por tratamento físico-químico e bioremediação com a microalga <i>Chlorella vulgaris</i> .....	9
2.1-Introdução.....	9
2.2-Metodologia.....	15
2.2.1- Digerido Total.....	15
2.2.2- Digerido Parcial .....	16
2.2.3- Borbulhado de estrume - Controlo positivo .....	16
2.2.4- Controlo.....	16
2.2.5- Caracterização do Digerido Total, Digerido Parcial e Borbulhado de estrume.....	17
2.2.6-Bioremediação do Digerido Total, Digerido Parcial e Borbulhado de Estrume com a microalga <i>Chlorella Vulgaris</i> .....	23
2.2.7- Caracterização do Digerido Total, Digerido Parcial e Borbulhado de Estrume após bioremediação com a microalga <i>Chlorella Vulgaris</i> .....	25

2.3-Apresentação e Discussão dos Resultados .....	26
2.3.1-Bioremediação do Digerido Total, Digerido Parcial e Borbulhado de estrume.....	26
2.3.2-Crescimento de microalgas, pH, temperatura e produção de biomassa algal .....	26
2.3.3-Caraterização dos efluentes antes e após a bioremediação.....	31
2.4-Conclusões .....	35
3- Pré-tratamento de estrume de bovino com vista à sua utilização como fertilizante estabilizado e meio de cultura de microalgas .....	36
3.1-Introdução.....	36
3.2-Metodologia.....	39
3.2.1- Determinação dos ensaios a realizar .....	39
3.2.2- Realização dos ensaios.....	44
3.2.3- Caracterização do efluente após pré-tratamento.....	45
3.2.4-Utilização da microalga <i>Chorella vulgaris</i> para bioremediação do efluente .....	46
3.3- Apresentação e Discussão dos Resultados .....	48
3.3.1- Análise das Respostas obtidas pelo software Design Expert .....	48
3.3.2- Crescimento de microalgas, pH e produção de biomassa algal.....	63
3.4-Conclusões .....	67
4- Bioremediação de efluente de aviário com a microalga <i>Chlorella vulgaris</i> em regime descontínuo e semicontínuo.....	68
4.1-Introdução.....	68
4.2-Metodologia.....	72
4.2.1- Diferentes formas de efluente de aviário utilizado .....	72
4.2.2- Caracterização das diferentes formas de efluente de aviário .....	72
4.2.3- Bioremediação do efluente bruto de aviário em regime descontínuo.....	72
4.2.4- Bioremediação do efluente bruto de aviário em regime semicontínuo 200 mL .....	73
4.2.5- Bioremediação do efluente bruto de aviário em regime semicontínuo de 150 mL .....	75
4.2.6- Bioremediação do efluente bruto de aviário em regime semicontínuo de 75 mL .....	78
4.2.7-Caraterização final da biomassa algal após os ensaios de bioremediação.....	82

4.3-Apresentação e Discussão dos Resultados .....	84
4.3.1-Bioremediação do efluente de Aviário .....	84
4.3.2- Ensaio semicontínuo com transferência de 200 mL de efluente.....	86
4.3.3- Ensaio semicontínuo com transferência de 150 mL de efluente.....	92
4.3.4- Ensaio semicontínuo com transferência de 75 mL de efluente.....	99
4.3.5-Valores finais obtidos Vs Valores limite de descarga águas residuais em meio hídrico natural .....	105
4.3.6- Caraterização final da biomassa algal obtida.....	106
4.4-Conclusões .....	109
5-Referências Bibliográficas .....	110
Anexos 1 .....	117

# Índice de Figuras

<b>Figura 1</b> -Esquema genérico do processo de produção de microalgas (Mata, Martins, e Caetano, 2010)	6
<b>Figura 2</b> - Evolução da produção de RU (106 t) e captação anual (kg/hab.ano) em Portugal Continental.....	12
<b>Figura 3</b> -D. Total, D. Parcial e Borbulhado de estrume.....	17
<b>Figura 4</b> -Esquema da Instalação .....	23
<b>Figura 5</b> -Curvas de crescimento dos efluentes e do Controlo .....	27
<b>Figura 6</b> -Efluentes antes e depois da bioremediação .....	28
<b>Figura 7</b> -Evolução do pH ao longo do ensaio .....	29
<b>Figura 8</b> -Contribuições globais da agricultura para as emissões de Gases de Efeito de Estufa (Slade, Riutta, Roslin, & Tuomisto, 2016) .....	38
<b>Figura 9</b> -Efluente antes do pré-tratamento, após o pré-tratamento e após filtração .....	45
<b>Figura 10</b> -Superfícies de reposta para a densidade ótica .....	52
<b>Figura 11</b> -Superfícies de reposta para massa de precipitado.....	56
<b>Figura 12</b> -Superfícies de reposta para Volume de filtrado .....	59
<b>Figura 13</b> - Superfícies de reposta para os Sólidos Totais.....	62
<b>Figura 14</b> -Curvas de crescimento do Reator nº18 e nº 22 ao longo do ensaio .....	63
<b>Figura 15</b> -Evolução da cor do reator 18 ao longo do ensaio .....	64
<b>Figura 16</b> -Evolução da cor do reator 22 ao longo do ensaio .....	64
<b>Figura 17</b> -Evolução do pH do Reator 18 e 22 ao longo do ensaio .....	65
<b>Figura 18</b> -Esquema da instalação em Regime Semicontínuo de 200mL .....	74
<b>Figura 19</b> -Esquema da instalação em Regime Semicontínuo de 150mL do efluente bruto filtrado e efluente bruto filtrado tratado.....	77
<b>Figura 20</b> -Esquema da instalação em Regime Semicontínuo de 75mL do efluente bruto filtrado tratado.....	80
<b>Figura 21</b> -Instalação Real .....	81
<b>Figura 22</b> -Curvas de crescimento dos 4 reatores até ao início das transferências.....	87
<b>Figura 23</b> -Curvas de crescimento dos 4 reatores após o início das transferências .....	88
<b>Figura 24</b> -Curvas de crescimento dos reatores com efluente bruto filtrado.....	92
<b>Figura 25</b> -Curvas de crescimento dos reatores com efluente bruto filtrado.....	94
<b>Figura 26</b> -Evolução pH dos reatores com efluente bruto filtrado .....	96



<b>Figura 27</b> -Evolução pH dos reatores com efluente bruto filtrado tratado .....	96
<b>Figura 28</b> -Curvas de Crescimento dos Reatores com efluente bruto filtrado .....	100
<b>Figura 29</b> -Curvas de Crescimento dos Reatores com efluente bruto filtrado tratado .....	101
<b>Figura 30</b> - Teor de Proteína final obtida .....	106
<b>Figura 31</b> -Teor de Lípidos finais obtidos .....	107
<b>Figura 32</b> -Teor de Carbohidratos+Cinzas obtidos .....	107

# Índice de Tabelas

<b>Tabela 1</b> -Classificação taxonómica das microalgas consoante a sua pigmentação (adaptado de (Carvalho, 2013) .....	5
<b>Tabela 2</b> -Tipos de Resíduos (Decreto-lei nº178/2006, de 5 de setembro) (Nunes, 2017) .....	10
<b>Tabela 3</b> -Quantitativos de RU produzidos (RARU 2017).....	11
<b>Tabela 4</b> -número de infraestruturas de gestão de RU existentes (RARU 2017).....	12
<b>Tabela 5</b> -Ru depositados em aterro face à meta 2020 .....	13
<b>Tabela 6</b> -Valores utilizados para a determinação do CBO5.....	22
<b>Tabela 7</b> -Preparação dos Reatores .....	24
<b>Tabela 8</b> -Produção e Produtividade da microalga <i>Chlorella vulgaris</i> .....	30
<b>Tabela 9</b> -Caraterização físico-química antes e depois da bioremediação com taxas de remoção .....	32
<b>Tabela 10</b> - Valores limite de descarga de águas residuais em meio hídrico natural (Anexo XVII, D.Lei 236/98 de 1 de Agosto) e Valores Finais Obtidos para os efluentes .....	34
<b>Tabela 11</b> -Variáveis utilizadas nos ensaios .....	41
<b>Tabela 12</b> -Dados inseridos no software.....	43
<b>Tabela 13</b> -Massa de cinzas, massa de estrume e volume água utilizados nos ensaios.....	47
<b>Tabela 14</b> - Desenho experimental com todas as respostas obtidas.....	49
<b>Tabela 15</b> - Parâmetros estatísticos da análise de variância (ANOVA) .....	50
<b>Tabela 16</b> -Equações geradas pelo software para o ajuste aos valores da densidade ótica .....	51
<b>Tabela 17</b> -Parâmetros estatísticos da análise de variância (ANOVA).....	53
<b>Tabela 18</b> --Equações geradas pelo software para o ajuste aos valores da Massa de precipitado.....	54
<b>Tabela 19</b> -Parâmetros estatísticos da análise de variância (ANOVA).....	57
<b>Tabela 20</b> -Equações geradas pelo software para o ajuste aos valores do Volume de filtrado .....	58
<b>Tabela 21</b> -Parâmetros estatísticos da análise de variância (ANOVA) .....	60
<b>Tabela 22</b> -Equações geradas pelo software para o ajuste aos valores dos Sólidos Totais.....	61
<b>Tabela 23</b> -Produção e produtividade no final do ensaio .....	66
<b>Tabela 24</b> -caraterísticas típicas dos efluentes de matadouros (Bustillo-Lecompte, Mehrvar, e Quiñones-Bolaños, 2016). .....	70
<b>Tabela 25</b> -Identificação dos reatores.....	75
<b>Tabela 26</b> -Identificação dos reatores.....	78
<b>Tabela 27</b> -Caraterização dos efluentes utilizados .....	84

<b>Tabela 28</b> -Características de efluentes de matadouro (Bustillo-Lecompte, Mehrvar, e Quiñones-Bolaños, 2016).....	85
<b>Tabela 29</b> --Produção da microalga <i>Chlorella vulgaris</i> .....	89
<b>Tabela 30</b> -Taxas de remoção obtidas .....	90
<b>Tabela 31</b> --Produção da microalga <i>C.Vulgaris</i> .....	97
<b>Tabela 32</b> -Taxas de remoção obtidas no ensaio .....	99
<b>Tabela 33</b> - Produção da microalga <i>Chlorella vulgaris</i> .....	102
<b>Tabela 34</b> -Possível produção de biomassa algal em escala real .....	103
<b>Tabela 35</b> -Taxas de Remoção.....	104
<b>Tabela 36</b> - Valores limite de descarga águas residuais em meio hídrico natura I(Anexo XVII, D.Lei 236/98 de 1 de Agosto) e Valores Finais após a bioremediação .....	105
<b>Tabela 37</b> -Resultados obtidos nos diferentes ensaios realizados ao longo do presente estudo .....	117



# Lista de abreviaturas

## Siglas e símbolos

APA – Agência Portuguesa do Ambiente

bs – base seca

CBO5 – carência bioquímica de oxigénio

CE – Comunidade Europeia

CO<sub>2</sub> – Dióxido de Carbono

CQO – carência química de oxigénio

D.Parcial- Digerido Parcial

D.Total- Digerido Total

DGEG – Direção Geral de Energia e Geologia

ETAR – estação de tratamento de águas residuais

FER – Fontes de Energias Renováveis

GEE – gases com efeito de estufa

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>- Ácido sulfúrico

hab-habitante

IEA – Agência Internacional de Energia

IEA – International Energy Agency

LULUCF – Uso do solo, reafecção do solo e silvicultura

NaOH – hidróxido de sódio

NH<sub>4</sub><sup>+</sup> - azoto amoniacal

PERSU – Plano Estratégico para os Resíduos Urbanos

PNAER – Plano Nacional de Acção para as Energias Renováveis

RARU-Relatório Anual de Resíduos Urbanos

RSU – Resíduos Sólidos Urbanos

RU- Resíduos Urbanos

SGRU-Sistema de Gestão de Resíduos Urbanos

UE – União Europeia

VLE – valor limite de emissão

## **Unidades**

°C – grau Celsius

d – dia

g – grama

g/L – grama por litro

GW – giga Watt

GW – Gigawatt

GWh – Gigawatt hora

h – hora

kg – quilograma

Kg/hab – quilograma por habitante

ktep – quilo tonelada equivalente de petróleo

kW- quilowatt

L – litro mL – mililitro

m<sup>2</sup> – metro quadrado

m<sup>3</sup> – metro cúbico

mg/L – miligrama por litro

min. - minuto

Mt – Megatonelada

MW – Megawatt

t – tonelada

$\mu\text{m}$  – micrómetro





# Objetivos

O objetivo do presente estudo passa pelo tratamento de efluentes com elevada carga orgânica através da utilização da microalga *Chlorella vulgaris* e possível valorização da biomassa algal obtida.

Pretende-se, também avaliar de que forma certas variáveis afetam algumas das características importantes, presentes nos efluentes, para o crescimento de microalgas, como a densidade ótica.

# 1-Introdução

## 1.1- Enquadramento legislativo

As alterações climáticas e a independência energética têm sido os grandes fatores de mudança, a nível internacional, no que toca às fontes de energia. Os grandes e constantes aumentos do preço dos produtos petrolíferos, a sua inacessibilidade e os problemas que provêm da sua utilização, como as suas emissões (aumento do aquecimento global, efeito de estufa, e outros) conduziu a que o principal foco passassem a ser as energias renováveis. A crescente preocupação com o agravamento de fenómenos climáticos, que se tem vivido ao longo deste século foi determinante para a realização e assinatura do protocolo de Quioto, que veio colocar metas para a redução das emissões de GEE (Carvalho, 2010). O pacote de medidas da UE para 2020 em matéria de alterações climáticas e de energias renováveis (Diretiva 2009/28/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 23 de Abril, 2009) propõe um compromisso de redução mínima de 20% de emissões de GEE até ao ano 2020, tendo como principais objetivos o aumento da utilização das energias renováveis para pelo menos 20% da produção energética total e a redução do consumo de energia para 20%, mediante um aumento da eficiência energética. O sector dos transportes deve possuir pelo menos 10% do seu combustível proveniente de fontes renováveis (Alves, 2015).

A procura de fontes alternativas de energia que permitam não só reduzir a dependência energética de fontes externas, mas também reduzir os níveis de emissões de GEE deu origem ao desenvolvimento de várias formas de produção de energia renovável (Carvalho, 2010). Em Portugal tem-se vindo a verificar um grande investimento na energia eólica e solar, para além da tradicional energia hídrica. A biomassa desempenha um papel importante na produção de energia em Portugal com uma capacidade instalada de cerca de 580 MW e com uma produção elétrica anual de 2618 GWh.

De acordo com a Diretiva 2015/1513 entende-se por biomassa, “a fração biodegradável de produtos, resíduos e detritos de origem biológica provenientes da agricultura (incluindo substâncias de origem vegetal e animal), da exploração florestal e de indústrias afins, incluindo da pesca e da aquicultura, bem como a fração biodegradável dos resíduos industriais e urbanos”. Assim, o termo biomassa engloba uma grande variedade de materiais/resíduos orgânicos com composições e origens distintas.

## 1.2- Valorização energética a partir de resíduos

A valorização energética de resíduos, é vista como uma das futuras fontes de energia renováveis mais determinantes, não só pelo seu potencial energético, mas também pela necessidade que existe em diminuir a quantidade de resíduos que é depositada em aterro. Os resíduos tal como lamas de ETAR, resíduos de matadouro, estrumes, resíduos de explorações agrícolas, resíduos de frutas e legumes e resíduos sólidos urbanos são de especial interesse, uma vez que estas fontes não competem com as culturas alimentares no uso de terras agrícolas. A sua valorização pode não só ajudar num decréscimo da utilização de energia fóssil como ainda ser um papel importante na atual política de mitigação de emissões de CO<sub>2</sub> ao reduzir emissões de metano, um gás com potencial de GEE 25 vezes superior ao CO<sub>2</sub> (Alves, 2015) (Global Methane Initiative, 2016).

Sendo assim, têm vindo a ser produzidos documentos legislativos e normativos, regulamentos e códigos de boas práticas visando a redução e valorização dos resíduos orgânicos, contemplando as diversas componentes da sua gestão, desde a produção e processamento até à utilização na agricultura.

De entre os resíduos orgânicos com interesse agrícola, os provenientes das explorações pecuárias suscitam, porventura, maiores preocupações, por duas ordens de razão: são os que se produzem em maiores quantidades na União Europeia, tendo ultrapassado o bilião de toneladas em 1985, atingindo valores cerca de três e seis vezes superiores aos das lamas provenientes das estações de tratamento de águas residuais urbanas (ETAR) e aos resíduos sólidos urbanos (RSU), respetivamente (Ferrero e L'Hermite, 1985); pelo facto de as explorações se concentrarem em regiões específicas, muitas das quais dispendo de reduzidas, ou mesmo inexistentes, áreas agrícolas. Disto resulta que, muitas vezes, a produção de estrumes e chorumes e, principalmente, as quantidades de Fósforo e Azoto veiculadas por estes resíduos, ultrapassam os níveis máximos recomendáveis de aplicação aos solos da exploração que os produz e mesmo aos localizados nas propriedades agrícolas de relativa proximidade, originando problemas ambientais. O Decreto-Lei n.º 73/2011, de 17 de junho, que estabelece a terceira alteração do Decreto-Lei n.º 178/2006, de 5 de setembro e transpõe a Diretiva n.º 2008/98/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 19 de novembro de 2008, relativa aos resíduos, prevê, no seu enquadramento legislativo, o reforço da prevenção da produção de resíduos e fomentar a sua reutilização e reciclagem, promover o pleno aproveitamento do novo

mercado organizado de resíduos, como forma de consolidar a valorização dos mesmos, com vantagens para os agentes económicos, bem como estimular o aproveitamento de resíduos específicos com elevado potencial de valorização (APA, 2014)(Decreto-Lei nº 73/2011 de 17 de Junho, 2011)(Despacho n.º 12571/2014, 2014).

As microalgas apresentam uma grande capacidade de remover eficientemente a carga orgânica e inorgânica presente nos resíduos. Além disso, determinadas espécies tendem a suportar condições adversas do meio, resistindo a níveis de poluição elevados, o que as torna adequadas para o tratamento de resíduos. De modo a potenciar a eficiência desta remoção é comum recorrer-se a uma etapa de pré-tratamento (Jorge, 2017).

### 1.3-Microalgas

As microalgas são os produtores unicelulares primários mais abundantes, procariontes ou eucariontes, que podem formar colónias, com pouca ou nenhuma diferenciação celular além de serem dotados de pigmentos, responsáveis por coloração variada e por metabolismo foto autotrófico (RAVEN et al., 2007) (Barcellos, Barreto, Machado, & Druzian, 2012). Estes organismos, fotossintéticos microscópicos, podem ser encontrados em todos os sistemas aquáticos, como, água doce, água do mar, lagos hipersalinos e até em desertos e ecossistemas árticos (Ganesan et al., 2014).

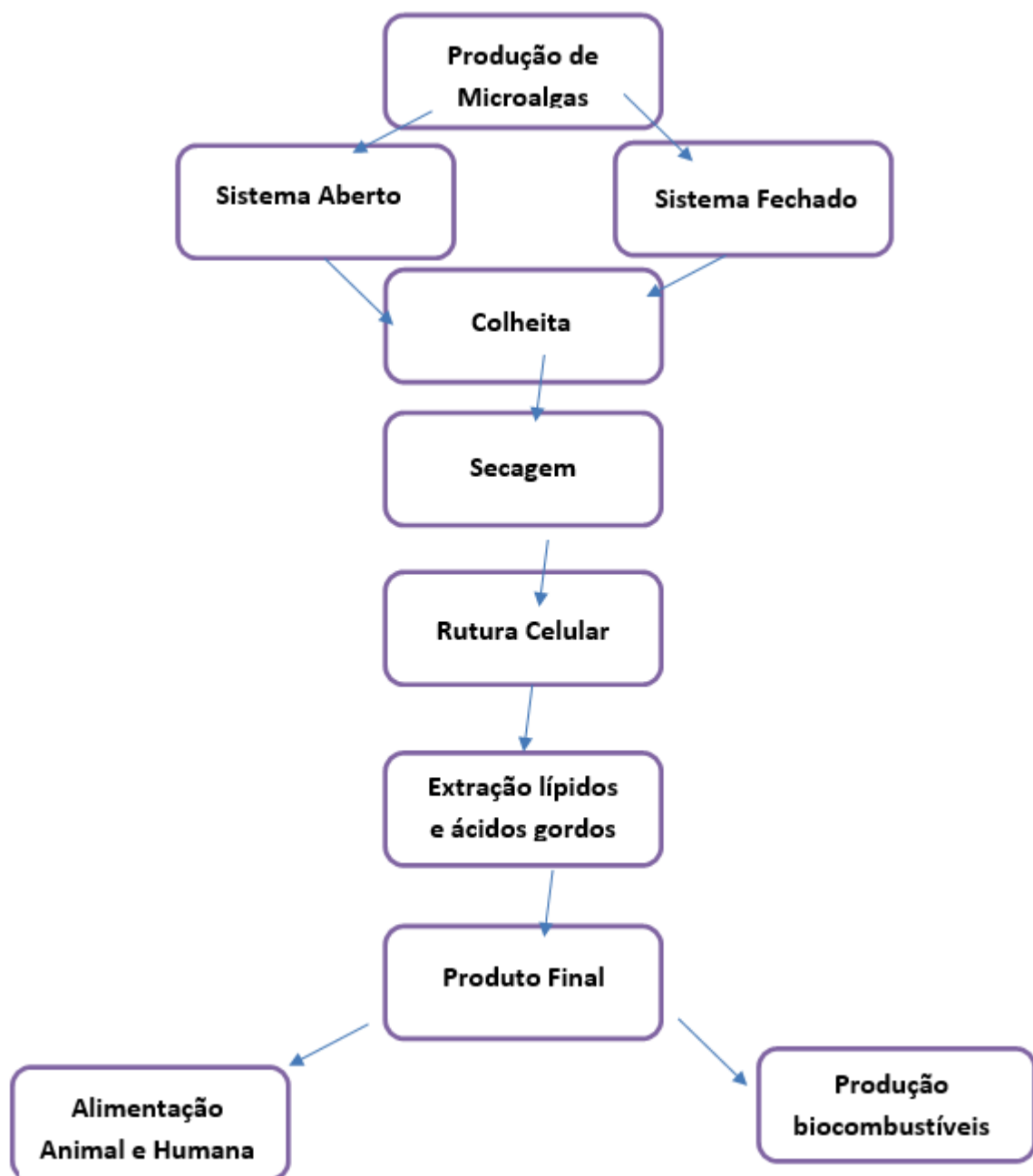
Possuem mecanismo fotossintético semelhante ao das plantas terrestres, no entanto, devido a uma estrutura celular mais simples e submersa em meio aquoso, ambiente onde têm um acesso mais eficaz a água, CO<sub>2</sub> e outros nutrientes, são geralmente mais eficientes na conversão de energia solar em biomassa (Priyadarshani I, Sahu D, 2011).

A classificação destes organismos baseia-se sobretudo na composição de pigmentos. A Tabela 1 representas as maiores classes conhecidas.

**Tabela 1**-Classificação taxonómica das microalgas consoante a sua pigmentação (adaptado de (Carvalho, 2013)

Designação Comum	Designação Científica
Algas verdes	<i>Chlorophyceae</i>
Algas Castanhas	<i>Phaeophyceae</i>
Dinoflagelados	<i>Pyrrophyceae</i>
Algas Douradas	<i>Chrysophyceae</i>
Diatomáceas	<i>Bacillariophyceae</i>
Algas vermelhas	<i>Rhodophyceae</i>
Cianobactérias	<i>Cyanophyceae</i>

Estima-se que existam entre 22.000 e 26.000 espécies de microalgas, das quais apenas algumas estão identificadas como sendo úteis para fins de aplicação comercial, como a *Spirulina*, *Chlorella*, *Haematococcus*, *Dunaliella*, *Botryococcus*, *Phaeodactylum* e *Porphyridium* (Carvalho, 2013).



*Figura 1*-Esquema genérico do processo de produção de microalgas (Mata, Martins, e Caetano, 2010)

O cultivo de microalgas pode ser efetuado em sistemas abertos (tanques ou lagos) e/ou em sistemas fechados (fotobioreatores.)

Os sistemas abertos são normalmente mais baratos de construir, possuem um ciclo de vida superior e uma grande capacidade de produção, quando comparados com os sistemas fechados. No entanto são mais suscetíveis às condições climáticas, não permitindo o controlo da temperatura da água, evaporação e iluminação, a contaminações de bactérias e outras microalgas e ocupam uma área mais extensa (Mata, Martins, e Caetano, 2010).

Os fotobioreatores são sistemas flexíveis que podem ser otimizados de acordo com as características biológicas e fisiológicas das espécies de microalgas cultivadas, permitindo assim o cultivo de microalgas que não podem sê-lo em sistemas abertos.

Este sistema oferece um maior controlo sobre as condições de cultivo e parâmetros de crescimento (pH, temperatura), evita a evaporação, reduz as perdas de CO<sub>2</sub>, permite atingir produtividades mais elevadas, oferecendo uma forma mais segura para o ambiente, evitando a contaminação ou minimizando a invasão por microrganismos concorrentes (Mata, Martins, e Caetano, 2010).

A biomassa algal, pode ser cultivada, colhida, usada e valorizada como fonte de nutrientes, tanto para humanos como para animais, mas também como matéria-prima para a produção de biocombustíveis, numa abordagem de Economia Circular. No entanto, o seu cultivo requer condições específicas de iluminação, escoamento e agitação (Mata, Martins, e Caetano, 2010).

A produção microalgal necessita de muitos fertilizantes, o que resulta em custos de operação bastante elevados, bem como em riscos ambientais, devido á fuga de nutrientes para o meio ambiente. A utilização de microalgas como agentes de bioremediação tem vindo a ganhar relevo, pois permite a utilização de efluentes, com elevada carga orgânica e inorgânica, ricos em fósforo e azoto, melhorando o desempenho económico e ambiental, uma vez que estes microrganismos conseguem absorver os nutrientes presentes nestes efluentes, incorporando-os nas suas células, melhorando a qualidade da água (Zhu & Hiltunen, 2016) (Kwon et al., 2017).

Kshirsagar, (2013) estudou o crescimento da microalga *Chlorella vulgaris*, entre outras, em águas residuais domésticas durante 20 dias. Foram obtidas taxas de remoção de 78,1%, 62,7% e 70-82% para Fósforo, Azoto e CQO, respetivamente (Kshirsagar, 2013).

Ji e colaboradores, (2013) analisaram a taxas de remoção através da microalga *Scenedesmus obliquus*, de Fósforo e Azoto de águas residuais provenientes de pocilga, tendo atingido resultados de 48-69% e 23-58%, respetivamente(Ji et al., 2013).

## 1.4- Economia circular

A Economia Circular tem sido um tema recorrente nas agendas internacional, Europeia e nacional nos últimos anos, sendo um conceito estratégico que assenta nos princípios da redução, reutilização, recuperação e reciclagem de materiais e energia e assumindo-se como um elemento chave para promover a dissociação entre o crescimento económico e o aumento no consumo de recursos. Numa Economia Circular, o valor dos produtos e materiais é mantido durante o maior tempo possível, a produção de resíduos e a utilização de recursos reduzem-se ao mínimo e, quando os produtos atingem o final da sua vida útil, os recursos mantêm-se na economia para serem reutilizados e voltarem a gerar valor (Direção-Geral das Atividades Económicas).



## 2- Valorização da fração orgânica de resíduos sólidos urbanos e estrumes por tratamento físico-químico e bioremediação com a microalga *Chlorella vulgaris*

### 2.1-Introdução

Resíduos urbanos são definidos como quaisquer resíduos produzidos num espaço urbano por atividade humana no seu dia-a-dia, que são deitados fora por serem inúteis e/ou indesejados pelo Homem (Decreto-lei nº178/2006, de 5 de setembro). Estes resíduos á primeira vista, podem não ter grande utilidade, no entanto, com a mudança de mentalidade da população em geral, hoje em dia consegue-se recorrer a diversas formas para o seu aproveitamento através da reutilização e/ou valorização, a partir de reciclagem, compostagem ou aproveitamento energético. Nos últimos anos, com o aumento populacional e sedentarismo tem-se verificado um aumento na produção, no consumo e consequentemente nos resíduos, conduzindo a uma degradação do meio onde vivemos. Assim a gestão de Resíduos Sólidos Urbanos tem vindo a ganhar destaque, tanto do ponto de vista ambiental como de saúde pública, sendo que a sua correta gestão leva à diminuição de pragas e doenças. (Nunes, 2017).

Prevê-se a aprovação de programas de prevenção e estabelecimento de metas de preparação para reutilização, reciclagem e outras formas de valorização material de resíduos, a cumprir até 2020 conforme o PERSU 2020, instrumento de referência da política de resíduos urbanos, aprovado na Portaria n.º 187-A/2014, de 17 de setembro que define como metas relativamente ao ano de referência 1995 (ano da aprovação do primeiro PERSU), a redução de 63% para 35% a deposição, em aterro, de resíduos urbanos biodegradáveis, o aumento de 24% para 50% da taxa de preparação de resíduos para reutilização e reciclagem e assegurar níveis de recolha seletiva de 47kg/habitante/ano (Câmara Municipal Lisboa, 2015).

Os princípios gerais estabelecidos para o PERSU 2020 são concretizados em objetivos, que fundamentam o estabelecimento das metas e medidas para os resíduos urbanos entre 2014 – 2020 (Alves, 2015) (APA, 2014). Surge assim a importância do tratamento e valorização de resíduos enquadrando-se como os objetivos de produção energética e redução de emissões de GEE.

Em Portugal os Resíduos são agrupados de acordo com a sua origem, como representado na Tabela 2.

**Tabela 2**-Tipos de Resíduos (Decreto-lei nº178/2006, de 5 de setembro)  
(Nunes, 2017)

<b>Tipo de Resíduos</b>	<b>Definição</b>
Resíduos Urbanos	Todos os resíduos produzidos domesticamente e por outras atividades semelhantes, sem que ultrapassem 1100L
Resíduos Industriais	Resíduos criados em atividades industriais, tal como os resíduos criados na produção e distribuição de energia e água
Resíduos Agrícolas	Resíduos gerados devido à exploração agrícola e pecuária
Resíduos Hospitalares	Todos os resíduos produzidos na área da saúde, unidades de cuidados de saúde, hospitais e clínicas veterinárias
Resíduos de Construção e Demolição	Todos os resíduos produzidos pelas atividades de construção, como a reconstrução, a ampliação, etc.

Quanto ao grau de perigosidade dos resíduos para o ser humano e meio ambiente, existe uma divisão em três graus: os resíduos perigosos, quer para a saúde quer para o ambiente, por terem certas características (explosão, combustibilidade, nocividade à saúde, cancerígenos, entre outros); os resíduos não perigosos: aqueles que não trazem problemas à saúde pública ou ao ambiente; e os resíduos inertes: não sofrem transformações físicas, químicas ou biológicas importantes (Nunes, 2017).

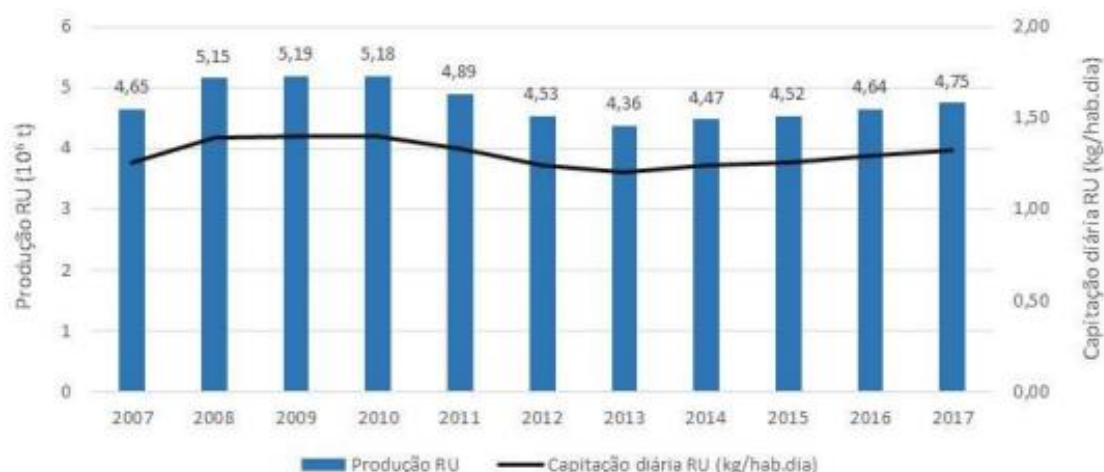
Para o ano 2017, verificou-se novo aumento na produção de resíduos urbanos. Foram geridos pelos SGRU de Portugal Continental, cerca de 4.745 mil toneladas, o que corresponde a um aumento de 2% relativamente a 2016. Este aumento poderá estar relacionado com uma melhoria da situação económica de Portugal, o que indica não estar, no contexto dos RU, a ser cumprido o objetivo de dissociar a produção de resíduos do crescimento económico. Por outro lado, constata-se também que

as medidas de prevenção da produção de resíduos não estão a ter os resultados esperados. Na Tabela 3 encontram-se representados os resultados quantitativos de RU produzidos e a variação verificada face ao ano anterior. (RARU 2017)

*Tabela 3-Quantitativos de RU produzidos (RARU 2017)*

Região	2013	2014	2015	2016	2017
<b>Portugal Continental</b>	4 363	4 474	4 523	4 640	4 745
<b>Região Autónoma da Madeira</b>	106	110	110	119	124
<b>Região Autónoma dos Açores</b>	139	136	132	132	137
<b>Total</b>	<b>4 608</b>	<b>4 719</b>	<b>4 765</b>	<b>4 891</b>	<b>5 007</b>
<b>Variação face ao ano anterior</b>	↓4%	↑2%	↑1%	↑3%	↑2%

Comparando estes resultados com anos anteriores, Figura 2, constata-se que os valores de produção total de RU rondam os registados nos anos 2011 e 2012. Para 2017, em Portugal Continental, apurou-se uma capitação de 484 Kg/hab/ano passando Portugal a situar-se acima da média Europeia (483 Kg/hab/ano) (RARU 2017).



**Figura 2-** Evolução da produção de RU (106 t) e capitação anual (kg/hab.ano) em Portugal Continental

No que respeita ao encaminhamento direto de RU para as principais operações de gestão, verifica-se a seguinte distribuição: 32% para aterro, 28% para tratamento mecânico e biológico, 21% para valorização energética, 10% para valorização material, 7% para tratamento mecânico e 2% para valorização orgânica. Contudo, ao efetuar uma análise considerando os destinos finais dos resíduos verifica-se que a distribuição, em termos percentuais varia substancialmente: 57% para aterro, 21% para valorização energética, 12% para reciclagem e 10% para compostagem/digestão. (RARU 2017).

Atualmente, em Portugal Continental, existem uma série de infraestruturas de gestão de Resíduos Urbanos, como representado na Tabela 4

**Tabela 4-** número de infraestruturas de gestão de RU existentes (RARU 2017)

Principais infraestruturas	Existentes
<b>Aterros</b>	32
<b>Tratamento Mecânico</b>	4
<b>Tratamento Mecânico e Biológico</b>	18
<b>Central de Valorização Orgânica (Recolha Seletiva)</b>	5
<b>Central de Valorização Energética</b>	2
<b>Estação de triagem</b>	30
<b>Estação de Transferência</b>	90
<b>Ecocentros</b>	197

Até 2020, em Portugal, terá de existir uma redução da quantidade total de RUB depositados em aterro para 35% face aos quantitativos totais produzidos em 1995 (RARU 2017).

*Tabela 5-Ru depositados em aterro face à meta 2020*

	RU depositados em aterro (% face a 1995)
<i>Resultado Obtido 2017</i>	43
<i>Meta 2020</i>	35

Qualquer material com algum potencial de reutilização, reencaminhado para aterros, diminui drasticamente a sua vida útil, provocando danos ambientais. É o caso da Fração Orgânica de Resíduos Sólidos Urbanos, a maior fração da gravimetria dos resíduos, em grande parte dos municípios. Assim surge um dos objetivos desta dissertação, verificar a possibilidade de tratar a Fração Orgânica de Resíduos Sólidos Urbanos, através do uso da microalga *Chlorella vulgaris*, como forma de remediar o efluente e valorização da biomassa algal produzida através do crescimento da cultura.

Vários estudos têm sido feitos, utilizando microalgas como forma de biorremediação de efluentes. Tanto os lixiviados de aterro, como as águas residuais são efluentes, que como a Fração Orgânica dos Resíduos Sólidos Urbanos, possuem uma elevada carga orgânica.

Znad, Al Ketife, Judd, AlMomani, e Vuthaluru, (2018), estudaram a eficiência de remediação e taxa de crescimento da microalga *Chlorella vulgaris* em águas residuais primárias, secundárias e efluente de petróleo. As águas residuais filtradas previamente através de um microfiltro (0,2µm) de nylon, foram autoclavadas a 120 °C, durante 15 min como forma de esterilizar o meio. Para as águas residuais primárias foram obtidas taxas de remoção de 22-34%, 100% e 80% para o CQO, Azoto Total e Fósforo Total, respetivamente, tendo sido atingida uma produção algal de 1,62 g/L. Já nas águas residuais secundárias foram obtidas taxas de remoção de 100% tanto para o CQO como para o Fósforo

Total. No efluente de petróleo foi atingida uma produção algal de 1,02 g/L e uma taxa de remoção do Fósforo Total de 78% (Znad, Al Ketife, Judd, AlMomani, & Vuthaluru, 2018).

Richars e Mullins, (2013) estudaram a possível remoção de metais, através de quatro espécies de microalgas marinhas diferentes, de lixiviado de aterro. Após 10 dias de ensaio, obteve-se uma taxa de remoção dos metais presentes no efluente de cerca de 95% (Richards & Mullins, 2013).

Marbelia e colaboradores estudaram o crescimento da microalga *Chlorella vulgaris* em fotobioreatores em regime descontínuo, durante 10 dias e em regime contínuo em bioreatores de membrana, utilizando águas residuais sintéticas, provenientes de comida de gato, atingindo produções de biomassa algal de 0-2-0,75 g/L (Marbelia et al, 2014).

Cheng e Tian, (2013) efetuaram uma avaliação da capacidade de uma espécie de *Scenedesmus* em remediar um lixiviado proveniente de uma localidade chinesa. Os autores verificaram que as maiores taxas de crescimento da estirpe isolada foram obtidas com as diluições mais elevadas, tendo sido possível obter taxas de remoção de 70%, 72%, 95% e 16% para Azoto Total,  $\text{NH}_4^+$ , Fósforo Total e CQO, respetivamente ao fim de 20 dias de cultivo (Cheng and Tian, 2013).

## 2.2-Metodologia

Neste trabalho procurou-se avaliar a capacidade da microalga *Chlorella vulgaris* para consumir nutrientes extraídos da fração orgânica contribuindo para a sua remediação e valorização como uma alternativa à sua utilização em compostagem ou à sua deposição em aterro.

Para tal procurou-se efetuar a solubilização destes nutrientes através de dois processos de digestão a quente em meio ácido, de forma a torná-los acessíveis às microalgas.

Estrume de vaca, um resíduo orgânico também disponível em grandes quantidades, foi também parcialmente solubilizado em água, a frio, para obter uma solução rica em nutrientes que pudesse servir como efluente de comparação com o digerido da fração orgânica dos resíduos sólidos orgânicos.

### 2.2.1- Digerido Total

O Digerido Total obteve-se, adicionando 0.5g da fração orgânica de RSU, previamente moída num moinho café, num tubo de ensaio, com 1,7 mL de H<sub>2</sub>O destilada e 3,3 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a (96%). Seguidamente o tubo foi colocado num banho termostaticado a 30°C durante 1 hora, sendo depois o seu conteúdo transferido para um frasco Schott de 250 mL, e diluído com 139 mL H<sub>2</sub>O destilada. De seguida colocou-se o frasco, devidamente fechado, em autoclave e aqueceu-se durante 1 hora à temperatura de 121°C. Por fim, após arrefecer, filtrou-se o conteúdo do frasco por papel de filtro, 0,2 µm (Whatman) e recolheu-se o filtrado num recipiente de plástico que se conservou no frio até posterior análise. Este método foi efetuado em triplicado. Inoculou-se utilizando 10 mL da cultura mãe da microalga *Chlorella vulgaris* em 450 mL de Digerido Total.

### 2.2.2- Digerido Parcial

De forma a obter o Digerido Parcial adicionaram-se 20g da fração orgânica de RSU e 200 mL de H<sub>2</sub>O, pH 2 (adicionou-se H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.5N a água com pH ≈7) num balão de fundo redondo de 250 mL e aqueceu-se a refluxo (condensador + Soxhlet +manta de aquecimento) durante 1h. Seguidamente filtrou-se o conteúdo do balão, por papel de filtro 0.45 µm (Whatman), recolheu-se o filtrado e adicionaram-se mais 200 mL de H<sub>2</sub>O, pH 2, ao resíduo da primeira extração e aqueceu-se a refluxo durante mais 1h após o que se filtrou todo o conteúdo, e combinaram-se os filtrados das duas extrações. Seguidamente colocou-se a solução num erlenmeyer de 1 L (cerca de 400 mL), aos quais se adicionaram 40g de cinzas de biomassa, e agitou-se a mistura utilizando uma placa de agitação e uma barra magnética, durante cerca de 1 h, de modo a solubilizar componentes das cinzas. No final filtrou-se o conteúdo do erlenmyer através de um filtro de pano para um recipiente plástico, e conservou-se o filtrado refrigerado a cerca e 5°C até posterior análise. Este processo foi efetuado em duplicado. Inoculou-se este efluente utilizando 10 mL da cultura mãe da microalga *Chlorella vulgaris* em 500 mL Digerido Parcial.

### 2.2.3- Borbulhado de estrume - Controlo positivo

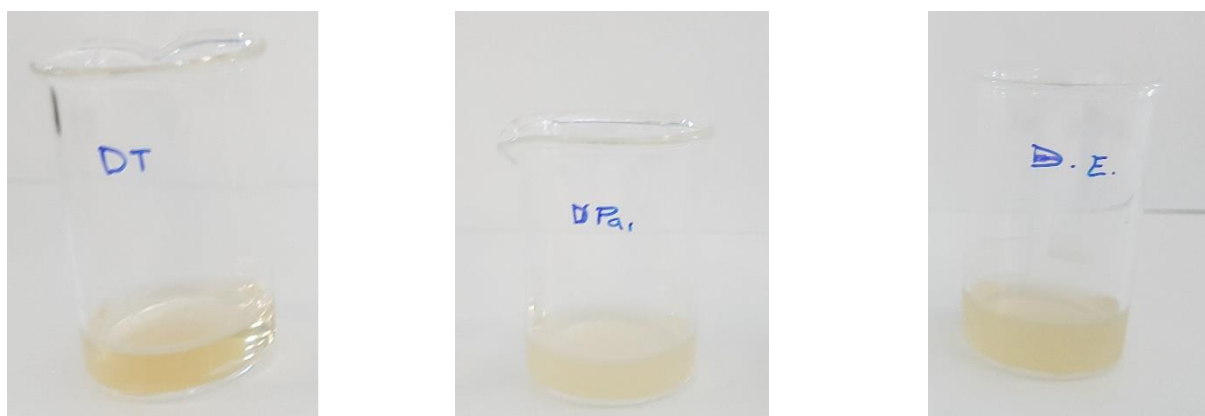
O borbulhado de estrume foi obtido através de um pré-tratamento físico-químico que consistiu na mistura de cerca de 100g de estrume de vaca com 125g de cinzas de biomassa e 2 L de água da torneira num erlenmeyer de 3 L. Seguidamente utilizou-se uma bomba de aquário, à qual se ligou um tubo de silicone e uma pipeta de 25mL de modo a efetuar a circulação do ar dentro da solução (arejamento), durante 24h. Por último filtrou-se a solução através de um filtro de pano e efetuou-se uma diluição de 1:4 devido à sua turbidez. Reservou-se a solução num recipiente de plástico, conservando-a no frio. Inoculou-se utilizando 10 mL da cultura mãe da microalga *Chlorella vulgaris* em 500 mL Borbulhado de estrume.

### 2.2.4- Controlo

O controlo foi obtido inoculando 10 mL da cultura mãe da microalga *Chlorella vulgaris* em 500mL de meio Chlorella.



O meio Chlorella foi obtido adicionando 500 mL água destilada, 1,25 g de fosfato de potássio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Sigma P 0662)) e 0,5 g de bicarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$ ) num balão volumétrico. Seguidamente, adicionou-se, noutra balão volumétrico, 500 mL de água destilada, 1,25 g de nitrato de potássio ( $\text{KNO}_3$ ), 1 g de sulfato de magnésio ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Sigma 230391)), 0,11 g de cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (Sigma C-3881)), 1 mL de meio ET Chu e 10 mL de Fe EDTA. Transferiu-se o conteúdo de cada balão volumétrico para o respetivo erlenmeyer. Por fim os erlenmeyers, devidamente fechados foram colocados na autoclave durante aproximadamente 1h. Após arrefecer juntou-se o conteúdo de cada erlenmeyer num recipiente de plástico. Este processo foi efetuado de modo a obter 1L de meio Chlorella.



*Figura 3-D. Total, D. Parcial e Borbulhado de estrume*

### 2.2.5- Caracterização do Digerido Total, Digerido Parcial e Borbulhado de estrume

De modo a efetuar a caracterização físico-química do Digerido Total, Digerido Parcial e Borbulhado de Estrume, avaliaram-se os seguintes parâmetros: Fósforo Total, Azoto Kjeldahl, nitritos, nitratos, CQO e CBO<sub>5</sub>.

Estes parâmetros foram determinados nos efluentes de partida bem como nos efluentes obtidos após um período de crescimento da microalga *C. vulgaris* em regime descontínuo, após centrifugação.

#### 2.2.5.1- Fósforo Total

A determinação do Fósforo Total foi realizada a partir do método 4500-P E. do Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, 1985)

##### 2.2.5.1.1- Digestão Amostra

Adicionaram-se 25 mL de amostra, 10 mL de ácido sulfúrico (Fisher Chemical >95%) e uma colher de mistura catalisadora (Se + K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), num tubo de digestão. Seguidamente colocou-se o tubo no digestor à temperatura de  $\approx 360^{\circ}\text{C}$  durante  $\approx 4\text{h}$ . A digestão considerou-se terminada quando a solução ficou incolor. Por último transferiu-se o digerido para um balão de 100 mL, lavando o tubo de digestão com água ultrapura (MILLIQ) e perfazendo o volume do balão. Seguidamente o digerido foi filtrado com um filtro de papel de 47 mm de diâmetro e 0,45  $\mu\text{m}$  de espessura para um recipiente de plástico e conservado no frio.

##### 2.2.5.1.2- Fósforo Total

Em primeiro lugar, preparou-se a solução redutora, adicionando, de acordo com o volume necessário da mesma, para o respetivo balão volumétrico, H<sub>2</sub>O ultrapura (MILLIQ), H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5N, molibdato de amónio, ácido ascórbico e tartarato de potássio, de acordo com as concentrações previstas no método e perfazendo o volume do balão volumétrico com H<sub>2</sub>O ultrapura (MILLIQ).

Seguidamente prepararam-se os padrões para a reta de calibração colocando, 2 mL da solução stock de fosfatos (50 $\mu\text{g(P)}$ =1mL) num balão volumétrico de 100 mL, perfazendo-o com H<sub>2</sub>O ultrapura (MILLIQ), de modo a preparar a solução de trabalho. Prepararam-se 6 balões volumétricos de 100mL

com solução de trabalho de fosfatos (0; 5; 10; 15; 20; 25 mL) e 8mL solução redutora, perfazendo-os com H<sub>2</sub>O ultrapura (MILIQ).

Por último, prepararam-se as amostras, adicionando o volume apropriado da amostra a analisar, algumas gotas de fenolftaleína e NaOH 6N, até que a amostra atingisse a cor rosa. Para finalizar adicionou-se 8mL da solução redutora previamente preparada, perfazendo os respectivos balões volumétricos com H<sub>2</sub>O ultrapura (MILIQ).

### 2.2.5.2- Azoto Kjeldahl

As amostras previamente digeridas para solubilizar o azoto orgânico. Para um tubo de destilação, pipetou-se o volume apropriado de amostra digerida, perfazendo-se a 100 mL com água ultrapura (MILIQ). Seguidamente, adicionou-se fenolftaleína e NAOH 6N, até que a amostra atingisse a cor rosa. Pipetaram-se 50 mL de solução de ácido bórico (20g/L, Panreac) para um erlenmeyer de 250 mL e juntou-se 0,5 mL de solução indicadora de ácido bórico. Colocou-se o tubo de destilação e o erlenmeyer no destilador (Kjeltec System 1002), de forma a proceder à destilação da amostra contida no tubo. De acordo com os resultados obtidos, foi efetuada ou não a titulação com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ≈ 0.02N. O teor de Azoto Kjeldahl é determinado através da seguinte equação 1:

$$\text{Azoto Kjeldahl (mg N/L)} = (v \times h \times 0.014 \times 10^3 \times \left(\frac{Vb}{Va \times Vc}\right)) \times 1000$$

**(EQ.1)**

Onde,

v– Volume H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gasto na titulação da amostra (mL)

h – Título da solução titulante de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Va – Volume de amostra usada na destilação (mL)

Vb – Volume do balão volumétrico utilizado na digestão (mL)

Vc – Volume de amostra usada na digestão (mL)

### 2.2.5.3- Nitritos

A determinação dos Nitritos foi realizada a partir do método 4500- $\text{NO}_2^-$  B. do Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, 1985)

Em primeiro lugar, prepararam-se os padrões para a reta de calibração colocando, num balão volumétrico de 50 mL, 12.5 mL da solução stock de nitritos (250mg/L) e perfazendo com  $\text{H}_2\text{O}$  destilada. Seguidamente retiraram-se 5 mL desta solução para um balão volumétrico de 500 mL, perfazendo com  $\text{H}_2\text{O}$  destilada obtendo assim a solução padrão de nitritos. Em balões volumétricos de 50 mL colocou-se 0; 0,5; 1; 2,5; 5; 7,5; 10; 12,5 mL da solução padrão de nitritos com um pouco de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada e acrescentou-se 1 mL de sulfanilamida, 1 mL NED, perfazendo com  $\text{H}_2\text{O}$  destilada.

Seguidamente, preparam-se as amostras, adicionando 20 mL da amostra, previamente filtrada, num balão volumétrico de 50 mL e acrescentando 1 mL de sulfanilamida, 1 mL NED e perfazendo com  $\text{H}_2\text{O}$  destilada. Após 20 minutos, leram-se as amostras no espectrofotômetro a 540 nm

### 2.2.5.4- Nitratos

A determinação dos Nitritos foi realizada a partir do método 4500- $\text{NO}_3^-$  I. do Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, 1985)

Prepararam-se as amostras, colocando, 2 mL de amostra previamente filtrada, num balão volumétrico de 50 mL, e adicionando 18 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada. Seguidamente, filtrou-se a solução, para um balão volumétrico de 50 mL, acrescentando 1 mL de sulfanilamida, 1 mL NED e perfazendo com  $\text{H}_2\text{O}$  destilada. Após 20 minutos, leram-se as absorvâncias das amostras, a 540 nm, no espectrofotômetro de UV-VIS (Biochrom Libra S4).

Os padrões utilizados para a reta de calibração dos nitratos foram os mesmos dos nitritos.

#### 2.2.5.5- CQO

A determinação da Carência Química de Oxigênio foi realizada a partir do método 5220B. do Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, 1985)

Pipetou-se um volume adequado de amostra para um tubo de digestão perfazendo com água destilada até um volume final de 20 mL, ao qual se adicionou, posteriormente, 10 mL de dicromato de potássio 0.25N,  $\frac{1}{3}$  de espátula de sulfato de mercúrio, de forma a eliminar possíveis cloretos presentes na amostra. Em seguida, levou-se o tubo para um banho frio e adicionaram-se 30 mL de ácido sulfúrico (Fisher Chemical >95%). Preparou-se, um ensaio em branco, substituindo a amostra por H<sub>2</sub>O destilada. Acoplou-se o condensador ao tubo e colocou-se no digestor a uma temperatura de  $\approx 160^{\circ}\text{C}$  durante 110 minutos. Após este período retiraram-se os tubos do digestor, deixou-se arrefecer um pouco e, os mesmos, foram colocados num banho frio, de forma a acelerar o processo de arrefecimento. Após o arrefecimento, transferiram-se as amostras para erlenmeyers de 150 mL, perfazendo com H<sub>2</sub>O destilada.

Por último, as amostras foram tituladas juntando a cada uma, três gotas de ferroína

O valor de CQO foi determinado de acordo com a equação 2:

$$CQO(\text{mgO}_2/\text{L}) = \frac{(B - A) \times M \times 8000}{M}$$

(EQ.2)

Onde,

B- Volume de solução titulante gasta na titulação do branco (mL)

A – Volume de solução titulante gasta na titulação da amostra M – molaridade da solução titulante

8000 – Peso miliequivalente de oxigênio x 1000 mL/L

M- Volume de amostra utilizado na digestão

#### 2.2.5.6- CBO<sub>5</sub>

A determinação da Carência Bioquímica de Oxigénio foi realizada a partir do método descrito no manual dos respirómetros Oxitop.

O volume de amostra a utilizar baseia-se no resultado obtido do CQO, de acordo com a seguinte tabela:

*Tabela 6-Valores utilizados para a determinação do CBO<sub>5</sub>*

<b>Intervalo de medição de 80% CQO (mgO<sub>2</sub>/L)</b>	<b>Volume de amostra a utilizar para o CBO<sub>5</sub> (mL)</b>	<b>Fator</b>
0-40	432	1
40-80	365	2
80-200	250	5
200-400	164	10
400-800	97	20
800-2000	43.5	50
2000-4000	27.5	10

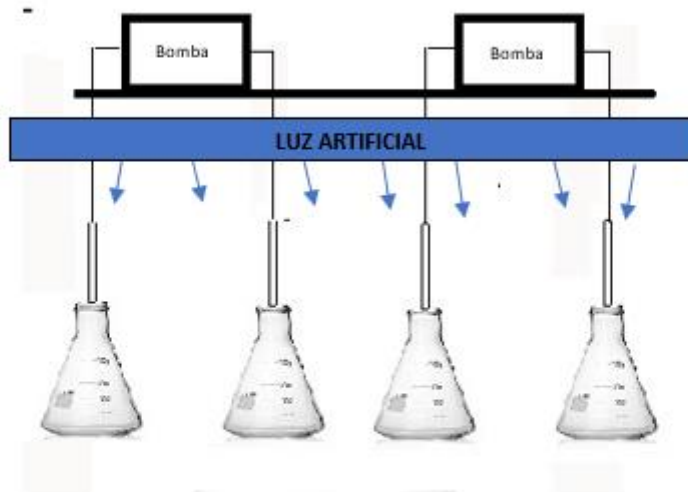
Pipetou-se, para o recipiente de CBO<sub>5</sub>, o volume de amostra a utilizar, a solução tampão de fosfatos, seguido da solução sulfato de magnésio heptahidratado, da solução cloreto de cálcio e da solução cloreto de ferro III numa proporção de 1:1000 do volume de amostra a utilizar. Por último colocou-se o tubo de borracha, adicionando 0,21g de NaOH, o sensor eletrónico Oxitop e colocou-se o recipiente num agitador magnético, em câmara escura, a 20°C durante 5 dias. Ao fim deste período foi efetuada a leitura e o valor de CBO<sub>5</sub> foi calculado, multiplicando o valor mais elevado obtido pelo fator utilizado.

## 2.2.6-Bioremediação do Digerido Total, Digerido Parcial e Borbulhado de Estrume com a microalga *Chlorella Vulgaris*

### 2.2.6.1- Instalação dos reatores para o crescimento da microalga *C.Vulgaris*

Para a instalação dos reatores foram usados erlenmeyers de volume adequado, aplicando, a cada um deles uma pipeta de 25 mL ligada por um tubo de silicone a uma bomba de aquário de modo a maximizar a agitação do meio e exponenciar o crescimento das microalgas. Cada um dos reatores foi fechado com algodão envolto em gaze, com o intuito de evitar a entrada de outros organismos dentro dos reatores, bem como de fixar a pipeta. Os reatores foram colocados numa bancada, dentro de uma sala, sob luz artificial provenientes de lâmpadas Led branca, 8000 Lux, com ciclos de 12h de luz e 12h de escuro.

A figura 11 ilustra, em esquema, a instalação real.



*Figura 4-Esquema da Instalação*

A Tabela 7 representa a informação sobre o volume de efluente colocado em cada reator, bem como o volume da cultura mãe utilizado de modo a proceder-se à inoculação da microalga *Chlorella vulgaris*

**Tabela 7-Preparação dos Reatores**

<b>Nome do meio e/ou efluente</b>	<b>Nome do Reator</b>	<b>Volume utilizado (mL)</b>	<b>Volume cultura mãe utilizado (mL)</b>
D.Total	D.Total	450	10
D.Parcial	D.Parcial	500	10
Borbulhado estrume	Borbulhado estrume	500	10
Meio Chlorella	Controlo	500	10

#### 2.2.6.2- Densidade ótica ou absorvância

Com uma pipeta 5 mL recolheu-se cerca de 3mL de amostra de cada um dos reatores (D.Total, D.Parcial, Controlo e Borbulhado de estrume), transferindo-a para uma cuvette de vidro, efetuando as diluições adequadas, homogeneizando-a e efetuando a leitura num espectrofotómetro (Vis Libra S4) a 680 nm.

Para cada um dos reatores, foi medida a densidade ótica, três vezes por semana e o pH foi medido semanalmente.

#### 2.2.6.3- pH

Para a determinação do pH, foi utilizado um medidor de pH (PHMT-600-001)



## 2.2.7- Caracterização do Digerido Total, Digerido Parcial e Borbulhado de Estrume após bioremediação com a microalga *Chlorella Vulgaris*

Após a biorremediação, foi efetuada a centrifugação (Sigma), a 5000 rpm durante 5 minutos, de cada reator, de modo a separar a biomassa algal do efluente já tratado. Tanto o efluente tratado, como a biomassa algal, foram armazenados em recipientes de plástico e reservados no frio. Foram efetuadas análises de modo a determinar o Fósforo Total, Azoto Kjeldahl, Nitritos, Nitratos, CQO, CBO<sub>5</sub> tal como se descreveu nas secções 2.2.5.1 a 2.2.5.6. Foi também, retirado um volume adequado de forma a analisar a produção de biomassa algal através do “peso seco” ou Sólidos Suspensos Totais.

### 2.2.7.1 Peso Seco ou Sólidos Suspensos Totais

Primeiramente, colocou-se na estufa, a  $\approx 105^{\circ}\text{C}$ , o filtro de fibra de vidro, de 47 mm de diâmetro e 0,45  $\mu\text{m}$  de espessura, numa placa de Petri, durante uma hora. Após esse período, retirou-se a placa de Petri+filtro da estufa, e colocou-se no exsiccador, até atingir a temperatura ambiente, de forma a ser possível pesar o filtro. Seguidamente filtrou-se, a vácuo, a amostra, previamente recolhida e colocou-se o filtro de novo na estufa a  $105^{\circ}\text{C}$ , durante uma hora. Por fim colocou-se a placa de Petri + filtro no exsiccador, até atingir a temperatura ambiente e pesou-se o filtro.

A equação seguinte permite calcular a massa de biomassa algal em cada litro de efluente (SST):

$$SST(g/L) = \frac{(md - ma)}{va} \times 1000$$

**(EQ.3)**

Onde,

md= Massa do filtro depois de filtrada a amostra

ma= Massa do filtro

va= Volume de amostra

## 2.3-Apresentação e Discussão dos Resultados

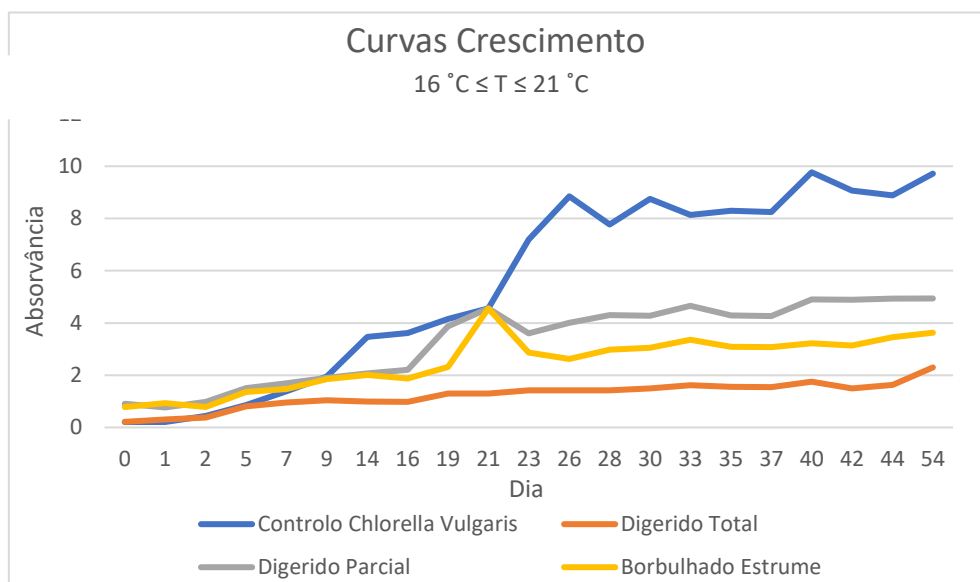
### 2.3.1-Bioremediação do Digerido Total, Digerido Parcial e Borbulhado de estrume

Nesta etapa do trabalho pretendeu-se avaliar a viabilidade da recuperação de nutrientes presentes na fração orgânica de dois resíduos complexos utilizando microalgas. O estudo da biorremediação de efluentes a partir da fração orgânica dos RSUs foi efetuado em paralelo com outros estudos, nomeadamente com borbulhado de estrume, assim, numa ótica de aproveitamento de recursos, este borbulhado de estrume foi utilizado como controlo positivo, para este estudo, pois tratava-se de um meio, estudado anteriormente, capaz de fornecer os nutrientes necessários para o crescimento de microalgas. Tanto a fração orgânica dos resíduos sólidos urbanos (RSUs) como o estrume de bovino são resíduos sólidos pelo que a solubilização de uma parte dos seus componentes foi o primeiro passo a realizar. No caso do estrume de bovino utilizou-se a dissolução em água à temperatura ambiente enquanto, no caso da fração orgânica dos resíduos sólidos urbanos se solubilizaram parte dos componentes deste resíduo em ácido sulfúrico diluído, a quente. Tanto no caso do digerido parcial da fração orgânica de RSUs como no caso do efluente resultante de estrume de bovino, utilizaram-se cinzas de biomassa para promover a coagulação de componentes que aumentam a viscosidade destes efluentes, aumentam a sua turvação e não são essenciais para o crescimento das microalgas. Seguiu-se o crescimento da microalga *Chlorella vulgaris*, através da medição da densidade ótica como descrito em 2.2.6.2, e monitorizou-se a evolução do pH, e da temperatura ambiente no período de crescimento.

Quando o crescimento das microalgas atingiu um estado estacionário interrompeu-se o ensaio e efetuou-se a caracterização físico-química (Fósforo Total, Azoto Kjeldahl, nitritos, nitratos e CQO) do efluente bioremediado.

### 2.3.2-Crescimento de microalgas, pH, temperatura e produção de biomassa algal

O crescimento de microalgas foi controlado através da medição da densidade ótica ou absorvância, como descrito em 2.2.6.2, efetuada três vezes por semana, de modo a ser possível obter a curva de crescimento para o D.Total, D.Parcial, Borbulhado de estrume e Controlo, representadas na figura 12.



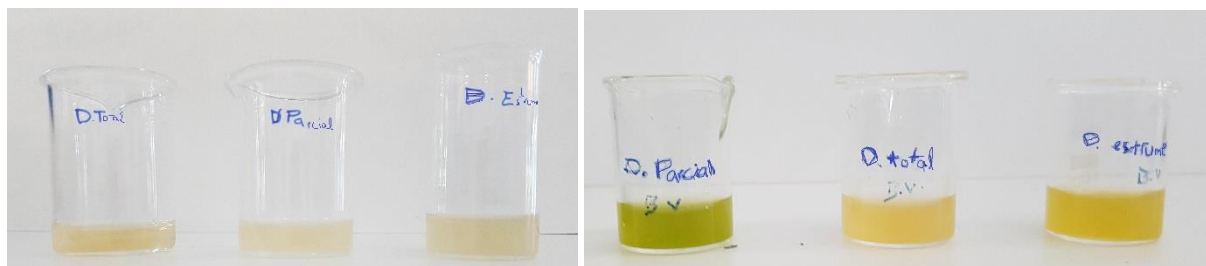
**Figura 5**-Curvas de crescimento dos efluentes e do Controlo

Quando a densidade da cultura se tornou muito elevada, as amostras foram diluídas de forma a que a densidade ótica se situasse na zona de resposta linear do espectrofotómetro e afetaram-se os resultados desta taxa de diluição, o que justifica os valores elevados de absorvância representados na Figura 12 e outros perfis de densidade ótica apresentados nesta tese.

O Controlo foi obtido inoculando 10 mL da cultura mãe da microalga *Chlorella vulgaris* em meio Chlorella. Este meio foi utilizado como indicativo de como seria o crescimento natural da microalga *Chlorella vulgaris*, nas condições ideais, comparando-o com os restantes meios, compostos por efluentes.

A partir da análise das diferentes curvas, verifica-se que o crescimento de microalgas passa por diferentes fases de crescimento, fase lag (de latência ou de arranque), fase exponencial, fase estacionária, fase de declínio (ou de morte)(Nicolau et al, 2014)

Estas quatro fases são também acompanhadas de uma mudança significativa na cor de cada efluente e do Controlo. A figura 13 ilustra a cor de cada efluente, no início e no fim da biorremediação, respetivamente.



*Figura 6-Efluentes antes e depois da bioremediação*

Verifica-se também, que o crescimento de microalgas no D. Parcial e no Borbulhado de estrume foi superior ao do D. Total. Este fato pode dever-se à utilização de cinzas de biomassa, tanto na preparação do D.Parcial como do Borbulhado de estrume. A fração das cinzas solubilizada na fase aquosa pode ter contribuído para o crescimento da cultura de microalgas, pois contêm as cinzas contêm macronutrientes inorgânicos importantes para o crescimento de microalgas, como o fósforo, o cálcio ou o azoto. No entanto, o uso de quantidades excessivas de cinzas de biomassa pode aumentar bastante a toxicidade do meio (Sandoval R. et al, 2015). Este pré-tratamento com cinzas torna a solução bastante alcalina,  $\text{pH} \approx 14$ , o que é uma forma de esterilizar o meio, eliminando microrganismos que possam estar contidos no efluente, evitando assim a competição destes com a microalga (Pittman, Dean, & Osundeko, 2011).

A curva de crescimento do D. Total apresenta declive nulo, durante o período em que decorreu o ensaio, sendo que este fato pode ocorrer devido aos seguintes fatores: toxicidade devida à solubilização de componentes tóxicos ou insuficiente presença de nutrientes dado que este digerido não foi tratado com cinzas

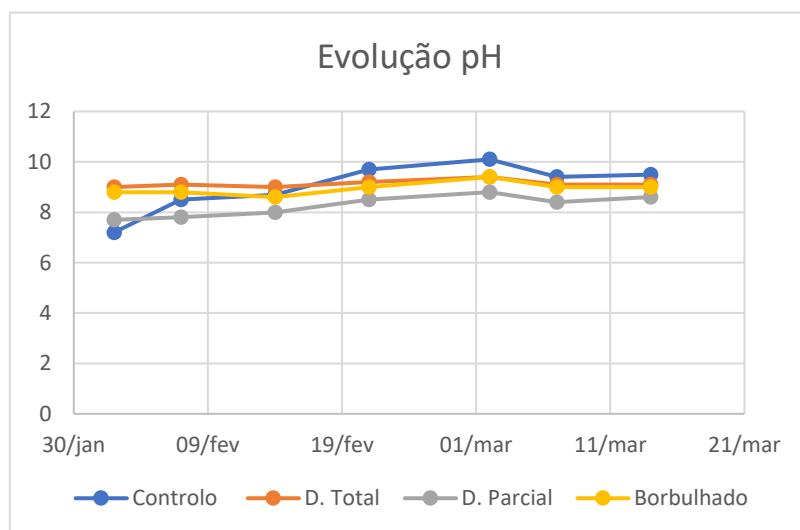
As curvas de crescimento dos reatores com os meios Controlo, D. Parcial e Borbulhado, apresentam um declive menor até ao 21º dia, registando-se a partir daí um aumento significativo no meio de Controlo e um aumento moderado nos outros dois meios. Esta observação parece sugerir que algum fator limitou o crescimento da microalga nestes três meios. Uma possibilidade é a temperatura que variou entre os 16 °C e os 21 °C, durante o período do ensaio. Estes valores situam-se dentro dos limites de 15 °C a 25 °C, geralmente referidos na literatura, como adequados para o crescimento de diversas microalgas. Temperaturas muito elevadas ou muito reduzidas podem levar rapidamente ao declínio da taxa de crescimento (Larsdotter, 2006). No caso da microalga *Chlorella vulgaris* a

temperatura ótima de crescimento é mais elevada, tendo sido referido que temperaturas de 30 °C permitem uma taxa de crescimento máxima enquanto variações de 3 °C num sentido crescente ou decrescente se traduzem numa diminuição desta taxa (Daliry et al., 2017).

No entanto, no caso do D. Parcial e Borbulhado o crescimento de microalgas manteve-se moderado após o 21º dia, como se pode observar, a partir das respetivas curvas de crescimento, o que sugere que estes meios apresentam carências de alguns nutrientes, relativamente ao meio de Controlo. O digerido obtido a partir da fração orgânica dos RSUs poderia apresentar alguma toxicidade, mas é menos provável que isso aconteça no meio obtido a partir do estrume de bovino. Por outro lado, se a fração solúvel das cinzas fosse responsável por alguma toxicidade, esse efeito não deveria ser observado no caso do digerido total obtido a partir da fração orgânica dos RSUs, à qual não se aplicou este tratamento.

Durante este ensaio, para além da medição da densidade ótica, mediu-se também o pH do meio de cultura para avaliar se ocorreram grandes variações e para verificar se os valores registados foram adequados ao crescimento da microalga.

A figura 14 representa a evolução do pH ao longo do ensaio.



*Figura 7-Evolução do pH ao longo do ensaio*

O pH dos reatores com os meios D. Total e Borbulhado que apresentaram um crescimento mais moderado, manteve-se relativamente constante em torno de 9, durante o ensaio.

Em contrapartida os reatores com os meios de Controlo e D. parcial apresentavam valores ligeiramente inferiores a 8 no início do ensaio e aumentaram para valores entre 8 e 10 durante o ensaio.

O aumento do pH foi mais evidente no reator com o meio de Controlo onde também se verificou um maior crescimento da microalga *C. vulgaris*. Este efeito pode observar-se com diferentes microalgas pois durante o seu crescimento removem dióxido de carbono do meio o que tem por efeito aumentar o pH. Assim este aumento do pH pode correlacionar-se com o crescimento da microalga *Chlorella vulgaris*, e os valores registados situam-se entre 7 e 10, a gama adequada para o crescimento de grande parte das espécies de microalgas (Barsanti et al, 2014).

No que diz respeito à produção e produtividade de microalgas em cada um dos reatores, estes parâmetros foram calculados com base nos valores obtidos de peso seco, no final do ensaio, para cada um dos reatores. A Tabela 8 apresenta os valores obtidos para a produção e produtividade de microalgas em cada um dos reatores, bem como a duração total do ensaio e o volume de efluente presente em cada reator.

**Tabela 8-Produção e Produtividade da microalga *Chlorella vulgaris***

	Nº dias de ensaio	Volume de efluente no reator (mL)	Produção microalgas (g/L)	Produtividade (g/L/dia)
<b>D.Total</b>	<b>54</b>	<b>450</b>	<b>103</b>	<b>1,91</b>
<b>D.Parcial</b>	<b>54</b>	<b>500</b>	<b>98,4</b>	<b>1,82</b>
<b>Borbulhado estrume</b>	<b>54</b>	<b>500</b>	<b>85,6</b>	<b>1,58</b>
<b>Controlo</b>	<b>54</b>	<b>500</b>	<b>105,2</b>	<b>1,98</b>

Como se pode observar pela análise dos dados obtidos, estes, não se encontram em concordância com as curvas de crescimento obtidas. Seria de esperar que o D. Total, o D. Parcial e o Borbulhado de estrume tivessem uma produção e produtividade inferior ao Controlo visto que o declive das respetivas curvas de crescimento é bastante inferior ao do Controlo, no entanto encontram-se muito próximos dos valores obtidos pelo Controlo. Este fator pode ser explicado, pelo fato de a medida de peso seco, sendo efetuada através de uma filtragem, de uma pequena quantidade de efluente, previamente homogeneizada, e depois pesada, pode conter, não só microalgas como

também partículas pertencentes ao próprio efluente que não têm dimensão suficiente para afetar significativamente a densidade ótica mas que são retidas no processo de filtração. Este efeito só é significativo para meios de cultura com uma quantidade significativa de sólidos suspensos e onde se verifica um crescimento fraco das microalgas.

Os resultados obtidos encontram-se bastante acima dos presentes na literatura, sendo que Znad, Al Ketife, Judd, AlMomani, e Vuthaluru, (2018), estudaram a eficiência de remediação e taxa de crescimento da microalga *Chlorella Vulgaris* em águas residuais primárias, secundárias e efluente de petróleo, atingindo a produção algal de 1,02-1,62 g/L (Znad, Al Ketife, Judd, AlMomani, & Vuthaluru, 2018).

Por outro lado, Marbelia e colaboradores estudaram o crescimento da microalga *Chlorella Vulgaris* em utilizando águas residuais sintéticas, atingindo produções de biomassa algal de 0-2-0,75 g/L (Marbelia et al, 2014).

Como se referiu, a comparação com a literatura não se pode efetuar através desta medida do peso seco devido à interferência dos sólidos suspensos totais, mas a observação visual das culturas está de acordo com as medidas de densidade ótica e confirma que estes meios apresentaram um crescimento inferior ao meio de controlo especialmente o D. Total.

### 2.3.3-Caraterização dos efluentes antes e após a bioremediação

De modo a efetuar a caracterização físico-química do D.Total, D.Parcial e Borbulhado de estrume, realizou-se um conjunto de análises de modo a determinar os seguintes parâmetros: Fósforo Total, Azoto Kjeldahl, nitritos, nitratos, CQO e CBO<sub>5</sub>, antes e depois da biorremediação através da microalga *Chlorella Vulgaris*, cujo resultados obtidos, bem como as respetivas eficiências de remoção, são apresentados na Tabela 9 .

**Tabela 9-**Caraterização físico-química antes e depois da bioremediação com taxas de remoção

Amostra	Fósforo		CQO		CBO		Azoto	
	mg/L	Taxa de remoção(%)	mgO <sub>2</sub> /L	Taxa de remoção(%)	mgO <sub>2</sub> /L	Taxa de remoção(%)	mg/L	Taxa de remoção(%)
D.Parcial Inicial	18,9	49,2	957,1	43,1	100,0	99,0	36,7	56,9
D.Parcial Final	9,6		544,2		1,0		15,8	
D.Total Inicial	4,0	-	330,0	-	60,0	100,0	11,0	28,2
D. Total Final	26,4		408,2		0,0		7,9	
Borbulhado Inicial	11,9	71,2	1221,1	61,0	650,0	99,4	44,1	85,7
Borbulhado Final	3,4		476,2		4,0		6,3	

Os valores iniciais de fósforo azoto e CQO nos diversos efluentes justificam o comportamento observado, pois como seria de esperar as microalgas cresceram mais nos meios com mais nutrientes, ou seja, o meio Borbulhado, seguido do D. parcial, seguido do D. total.

O Borbulhado de estrume foi o efluente que apresentou as taxas de remoção mais elevadas, com valores de 71,2%, 61%, 99,4% e 85,7% para as taxas de remoção do fósforo total, CQO, CBO<sub>5</sub> e azoto Kjeldahl, respetivamente.

Esta diferença deve-se ao facto de as populações de microalgas não terem atingido nos vários meios, densidades suficientemente elevadas para permitir uma bioremediação adequada, logo as taxas de bioremediação foram proporcionais ao crescimento das microalgas mais do que influenciadas pela natureza dos meios.

A razão entre CBO<sub>5</sub> e CQO é um índice da maior ou menor biodegradabilidade de um efluente sendo que se considera que um efluente tem uma baixa biodegradabilidade quando a razão CBO<sub>5</sub>/CQO é inferior a 0,1, ou seja o efluente contém uma quantidade significativa de contaminantes oxidáveis que não são fáceis de biodegradar, seja pela sua estabilidade, seja pela sua toxicidade relativamente aos organismos envolvidos na bioremediação (MATOS J. et al, 2011). No caso destes três efluentes a razão CBO<sub>5</sub>/CQO foi de 0,11, 0,18 e 0,53 para os meios D. parcial, D. total e Borbulhado, o que evidencia uma maior biodegradabilidade deste último. Este resultado indica que os meios resultantes da solubilização da fração orgânica dos RSUs, apresentam compostos pouco biodegradáveis ou mesmo com alguma toxicidade para as algas, o que justifica também o seu fraco crescimento.

Assim o efluente obtido a partir de estrume de bovino parece ser mais adequado para o crescimento das microalgas e poderá ser utilizado para suplementar meios mais pobres como os obtidos a partir da fração orgânica dos RSUs. O baixo nível de nutrientes obtidos a partir da fração orgânica dos RSUs poderá ser consequência da solubilização desses nutrientes, durante o tratamento MBT dos RSUs, em fases aquosas que depois constituem o efluente deste processo.



Wang e colaboradores utilizaram estrume de bovinocultura como uma forma de tentar exponenciar o crescimento da espécie de microalga *Chlorella*, utilizando diferentes diluições. Analisaram também as taxas de remoção de alguns nutrientes tendo obtido valores de 75,7-82,5 %, 62,5-74,7% e 27,4-38,4% para as taxas de remoção do azoto Kjeldahl, fósforo total e CQO, respetivamente (Wang et al., 2010).

Os resultados obtidos de taxas de remoção do fósforo total e do azoto Kjeldahl, para o Borbulhado de estrume, encontram-se dentro dos valores referidos na literatura, apesar de se tratarem de algas diferentes. No entanto a taxa de remoção obtida para o CQO supera em larga escala os resultados obtidos por outros autores. Este fato pode dever-se ao pré-tratamento efetuado ao estrume de bovinocultura, antes da inoculação da microalga *C. vulgaris*, com cinzas de biomassa (Wang et al., 2010).

O D. Parcial apresentou taxas de remoção de 49,2%, 43,1%, 99% e 56,9% para o fósforo total, CQO,  $CBO_5$  e azoto Kjeldahl, respetivamente, enquanto que as taxas de remoção obtidas pelo D. Total foram de 100% para o  $CBO_5$  e de 28,2% para o azoto Kjeldahl. O aumento do fósforo total e do CQO do D. Total, no fim do ensaio pode dever-se ao fato da cultura de microalgas, neste efluente, ter morrido, o que faz com que possa ocorrer redissolução dos nutrientes absorvidos, no meio, o que leva ao aumento do Fósforo Total do CQO.

Singh, Birru e Sibi (2017) utilizaram a microalga *C. vulgaris* para remediar águas residuais urbanas, utilizando volumes diferentes de efluente, tendo atingido taxas de remoção de 93,4-98,4% e de 78,3-87,9% para o fósforo total e azoto Kjeldahl, respetivamente (Singh, Birru, & Sibi, 2017). Pode-se concluir que os resultados obtidos no presente estudo ainda se encontram distantes dos resultados obtidos por outros autores, o que pode ser explicado pela possível toxicidade do meio e/ou por algum metal pesado presente na fração orgânica de RSU que não foi possível ser processado pela cultura de microalgas.

Almomani and Örmeci (2016) utilizaram a microalga *C. vulgaris* de forma a avaliar o potencial desta em remover nutrientes de águas residuais, tendo sido atingidas taxas de remoção de CQO, de 40,1% para o efluente primário e de 49,1% para o efluente secundário (Almomani & Örmeci, 2016). Assim verifica-se que o resultado de taxa de remoção do CQO no D. Parcial encontra-se em conformidade com os valores referidos na literatura.

Apesar dos resultados obtidos pelos autores não poderem servir de comparação direta com os obtidos pelo presente estudo, permitem comprovar a grande eficácia das microalgas na remoção nutrientes de efluentes com elevada carga orgânica.

Em Portugal os parâmetros definidos para a libertação de águas residuais em meio hídrico natural são definidos pelo Anexo XVIII - Descarga de águas residuais em meio hídrico natural) D. Lei 236/98 de 1 de Agosto (Tabela 10).

**Tabela 10-** Valores limite de descarga de águas residuais em meio hídrico natural (Anexo XVII, D.Lei 236/98 de 1 de Agosto) e Valores Finais Obtidos para os efluentes

	Rede de águas residuais domésticas	Rede de águas residuais pluviais
Parâmetros a avaliar	VLE (Anexo XVIII - Descarga de águas residuais em meio hídrico natural) D.Lei 236/98 de 1 de agosto	
pH (Escala de Sörensen)	entre 6 e 9	
Carência bioquímica de Oxigénio "CBO5" (mg/L O2)	40	
Carência Química de Oxigénio "CQO" (mg/L O2)	150	
Sólidos Suspensos Totais "SST" (mg/L)	60	
Azoto amoniacal (mg/L NH4)	10	
Nitritos (mg/L NO2)	-	
Nitratos (mg/L NO3)	50	
Azoto total (mg/L N)	15	
Fósforo total (mg/L P)	10	

	pH	Fósforo	CQO	CBO	Azoto
Amostra	(Escala de Sörensen)	mg/L	mgO2/L	mgO2/L	mg/L
D.Parcial Final	8,6	9,6	544,2	1,0	15,8
D. Total Final	9,1	26,4	408,2	0,0	7,9
Borbulhado Final	9	3,4	476,2	4,0	6,3

Assim verifica-se que após a bioremediação, os efluentes (tabela 5) não se encontram em conformidade com os limites máximos de descarga de águas residuais em meio hídrico natural, não sendo possível a sua descarga.

Este resultado indica que apesar de os meios testados apresentarem valores iniciais de CQO, azoto e fósforo moderados por comparação com outros efluentes, o efeito determinante da bioremediação foi o desenvolvimento apropriado das culturas que ao não ocorrer, comprometeu a eficiência do processo.

## 2.4-Conclusões

Neste ensaio foi estudada a possível bioremediação da Fração Orgânica de Resíduos Sólidos Urbanos, recorrendo-se a diversos pré-tratamentos seguidos da inoculação da microalga *Chlorella vulgaris* dos efluentes resultantes destes.

Verificou-se que esta fração orgânica mesmo quando submetida a uma digestão total não é uma fonte abundante de nutrientes que sustentem o crescimento da cultura de microalgas.

A baixa taxa de crescimento registada para a cultura de microalgas no meio de controlo enquanto a temperatura ambiente foi inferior a 20 °C, indica ser este um parâmetro que interessa controlar se se pretende atingir densidades celulares elevadas.

A combinação destes digeridos da fração orgânica dos RSUs, com cinzas de biomassa ou estrume de bovino pode ser uma estratégia adequada para aumentar a concentração de nutrientes disponíveis para suportar o crescimento da população de microalgas e assim atingir taxas de bioremediação mais elevadas.

### 3- Pré-tratamento de estrume de bovino com vista à sua utilização como fertilizante estabilizado e meio de cultura de microalgas

#### 3.1-Introdução

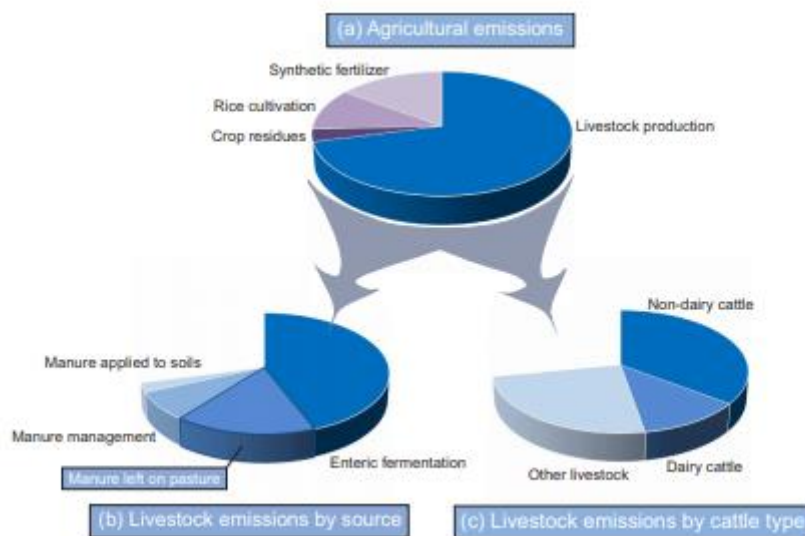
A composição dos estrumes e dos chorumes é bastante variável dependendo, entre outros fatores, da espécie, da idade dos animais, da finalidade com que são explorados, do regime alimentar e do tipo de estabulação, da quantidade e natureza do material utilizado nas camas e do sistema de produção utilizado. As quantidades de estrume e de chorume produzidas anualmente nas explorações variam, sobretudo, com as espécies e os sistemas de exploração. O tipo de estrume produzido depende da quantidade de palhas e/ou de outros materiais usados nas camas, da proporção de fezes e urina com eles misturada, da temperatura atingida durante a fermentação e do grau de curtimenta final, podendo obter -se estrumes mais ou menos palhosos e mais ou menos ricos em nutrientes, conforme os casos. A quantidade de chorume produzido depende do seu grau de diluição com as águas de lavagem dos estábulos e outras que afluem à fossa onde são recolhidas as urinas, com quantidades, maiores ou menores, de fezes em suspensão e de restos de rações, palhas, fenos, silagem ou outros materiais (Despacho nº 1230/2018, 2018).

Trata-se de um fertilizante valioso pois contém uma ampla gama de nutrientes, como o Azoto, o Fósforo e o Potássio, bem como macronutrientes como o Cobre, o Manganês e o Zinco. Estrumes que contenham os materiais utilizados nas camas do gado, também constituem uma fonte de matéria orgânica, podendo ser usados como fertilizantes naturais, o que melhora a qualidade do solo. No entanto devido à grande variabilidade do seu teor de água, nutrientes e matéria orgânica, os estrumes são mais difíceis de manejar, armazenar e aplicar do que os fertilizantes sintéticos (Manitoba-Agriculture-Food-and-Rural-Development, 2015).

Um dos maiores problemas relacionados com a produção animal, a nível industrial, é a grande produção de estrumes que lhe está associada, pois tratando-se de materiais biodegradáveis e contaminados com uma carga microbiana considerável constituem potenciais agentes de propagação de doenças e de compostos ecotóxicos. A população de gado suíno e bovino do planeta, cerca de 2,5 biliões, produz por ano cerca 80 milhões de toneladas de estrume. Toda a população humana, em comparação, produz apenas cerca de 30 milhões de toneladas. Nos Estados Unidos, por exemplo, a quantidade de estrume animal produzido é cerca 130 vezes superior à quantidade de dejetos humanos, não estando sujeito ao mesmo nível de tratamento. A contaminação das águas subterrâneas com nitratos proveniente dos estrumes animais pode causar graves riscos para a saúde pública. Altos níveis de nitratos encontrados em poços de água perto de unidades de crescimento e engorda, por exemplo, têm sido relacionados com um maior risco de aborto (da Silva, 2005).

Em Portugal, por ano são produzidas cerca de 64,5 e 60 t por Cabeça Normal de chorume e estrume de bovino, respetivamente (Despacho nº 1230/2018, 2018).

Estima-se que a agricultura e as mudanças associadas ao uso da terra tenham contribuído com cerca de 30%, 8 Gt de emissões de CO<sub>2</sub> por ano, do total global das emissões antropogénicas em 2010. Das emissões de Gases de Efeito de Estufa relacionadas com o Sector agrícola, a produção de gado é responsável por cerca de dois terços, com emissões diretas de 4,6 Gt de emissões de CO<sub>2</sub> por ano, provenientes, maioritariamente do processo digestivo dos animais. A produção de carne bovina e de produtos lácteos são responsáveis por cerca de 60% das emissões totais provenientes da produção pecuária, sendo os estrumes um dos principais contribuintes de Gases de Efeito de Estufa (Slade, Riutta, Roslin, & Tuomisto, 2016).



**Figura 8-**Contribuições globais da agricultura para as emissões de Gases de Efeito de Estufa (Slade, Riutta, Roslin, & Tuomisto, 2016)

Assim surge, então a solução de bioremediação e/ou Valorização de efluentes provenientes de bovinocultura, mais propriamente os estrumes, através da utilização de microalgas, por forma a reduzir a eutroficação, removendo nutrientes inorgânicos presentes nos estrumes, enquanto se produz biomassa que pode ser usada para a produção de biocombustíveis, ração animal e fertilizantes (Asmare, Demessie, & Murthy, 2014).

Asmare, Demessie, e Murthy (2014) estudaram o crescimento e a remoção de nutrientes de águas residuais de uma fábrica de produtos lácteos com diferentes diluições, 10 e 25 %, através da microalga *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus dimorphus* e uma co-cultura de ambas. Obtiveram produções de 0,290-0,543 g/L, 0,145-0,364 g/L e 0,400-0,612 g/L para a *Scenedesmus dimorphus*, *Chlorella vulgaris* e co-cultura, respetivamente. Para a taxa de diluição de 25%, a co-cultura foi a que obteve a maior produção, produtividade e taxa de remoção para o Azoto, Fósforo e Sólidos totais, no entanto para a taxa de diluição de 10% foram obtidos resultados semelhantes, excepto na produtividade e na taxa de remoção do Azoto cujo os valores máximos foram obtidos pela *Scenedesmus dimorphus*. (Asmare, Demessie, & Murthy, 2014).

Hena, Fatimah, e Tabassum (2015) estudaram a capacidade de produção de biodiesel a partir de águas residuais provenientes de quintas de gado leiteiro, através de um consórcio de culturas de

microalgas nativas, dividindo-as em dois tanques, um com águas residuais tratadas e outro com não tratadas. Uma estirpe, foi capaz de remover cerca de 98% dos nutrientes presentes nas águas residuais tratadas, e apresentou um conteúdo lipídico de cerca de 16,98%, sendo que 72,70% destes lípidos poderiam ser convertidos em biodiesel (Hena, Fatimah, & Tabassum, 2015).

Lu, Wang, Wang e Yuan (2015) estudaram a produtividade e as taxas de remoção de nutrientes (CQO, Fósforo Total e Azoto Total) a partir de águas residuais de gado leiteiro, em fotobioreatores interiores, à escala laboratorial e em fotobioreatores exteriores, à escala piloto, utilizando espécie *Chlorella*. Produtividades de 260 mg/L/dia e 110 mg/L/dia foram obtidas para os fotobioreatores interiores e exteriores, respetivamente. As remoções máximas obtidas nos fotobioreatores interiores foram de 88,38 mg/L/dia, 38,34 mg/L/dia e 2,03 mg/L/dia para o CQO, Fósforo Total e Azoto Total, respetivamente, enquanto que para os fotobioreatores exteriores foram atingidas remoções de 41,31 mg/L/dia para o CQO, 6,58 mg/L/dia para o Azoto Total e 2,74 mg/L/dia para o Fósforo Total (Lu, Wang, Wang, & Yuan, 2015).

## 3.2-Metodologia

### 3.2.1- Determinação dos ensaios a realizar

Neste trabalho pretendeu-se estudar parâmetros que afetam a solubilização de nutrientes existentes em estrume de bovino, durante o processo de dissolução parcial deste resíduo em água, bem como o efeito da adição de cinzas ao efluente obtido.

Neste processo começa-se por misturar o estrume sólido com água e nesta etapa a razão estrume:água, o pH da água e a forma de agitação são parâmetros que influenciarão de forma determinante as características do efluente obtido.

Por outro lado, já tinha sido determinado em trabalhos anteriores (Viegas et al., 2018), que a adição de cinzas de biomassa a efluentes destinados à produção de microalgas apresentava a dupla vantagem de fornecer nutrientes adicionais às microalgas, como resultado da dissolução parcial das cinzas e provocava a coagulação e precipitação de alguns componentes orgânicos responsáveis pela turvação do efluente, facilitando assim a penetração da luz no meio de crescimento das microalgas.

Assim procurou-se também estudar a razão cinzas:estrume para avaliar o efeito deste parâmetro experimental nas características finais do efluente obtido.

Após a solubilização em água e tratamento com cinzas obtém-se uma fração solúvel que contém nutrientes do estrume e das cinzas de biomassa e um precipitado que contém os componentes não solubilizáveis do estrume e das cinzas bem como o excesso de cinzas pois a quantidade de cinzas adicionada para obter um efeito adequado de aumento do pH é geralmente mais elevada do que aquela que é solúvel a frio no volume de água adicionado. Este resíduo sólido é separado na filtração e pode ser usado como um fertilizante sólido para agricultura pois ainda contém uma quantidade significativa de nutrientes.

Com o intuito de estudar quais as variáveis que influenciam a densidade ótica do efluente, a massa de precipitado, o volume de efluente filtrado e a concentração de Sólidos Totais em estrume de bovino pré-tratado com cinzas de biomassa, recorreu-se a um algoritmo usado no estabelecimento das superfícies de respostas, *I-optimal*, que privilegia um desenho experimental que minimiza a variância das previsões. As grandes vantagens desta opção, quando comparado com modelos mais convencionais como o *Central Composite Design* são que o modelo assenta essencialmente num menor número de ensaios requeridos e o fato de se originar uma melhor distribuição de ensaios em torno das condições mais extremas (Mohamed, Masood, & Bhowmik, 2017) (Pereira, 2018).

As variáveis que se pretenderam avaliar na medida em que poderiam influenciar os parâmetros críticos enunciados anteriormente (densidade ótica, massa de precipitado, volume filtrado e concentração de Sólidos Totais) foram o pH da solução aquosa, a razão estrume:água, a razão mássica cinzas:estrume, o tempo de contato e a modalidade de agitação. O desenho experimental sugerido pelo software Design-Expert version englobou um total de 30 ensaios, dos quais 20 seriam usados determinação do modelo, 5 para estimar a falta de ajuste ("*lack of fit*") e 5 réplicas para permitir estimar o erro puro. A Tabela 11 contém todas as variáveis e respetivos valores introduzidos no software, enquanto que a Tabela 12 representa todos os dados inseridos no software, de forma a obter o desenho experimental (Mohamed, Masood, & Bhowmik, 2017) (Pereira, 2018).

As análises de regressão foram efetuadas pelo programa assim como a análise de variância (ANOVA), levada a cabo para identificar a significância dos fatores isolados, das suas interações e ainda termos quadráticos, relativamente à sua influência nas respostas obtidas e analisadas, considerando-se significativos quando  $p < 0,05$  (Mohamed, Masood, & Bhowmik, 2017) (Pereira, 2018).



**Tabela 11**-Variáveis utilizadas nos ensaios

<b>Variáveis</b>	<b>Valores Introduzidos</b>
pH água	8;10;12
Razão estrume: água	10g :150mL; 15g :150mL; 30g:150mL
Razão mássica cinzas:estrume	0,5:1; 1:1; 1,5:1
Tempo contacto (h)	1;6;12;48
Modalidade de agitação	Borbulhamento ou agitação magnética



**Tabela 12-Dados inseridos no software**

Ensaio	Fatores				
	A: Razão água/estrupe	B: p H	C: Razão cinza/estrupe	D: tempo contato	E: modalidade de agitamento
1	5	10	0.5	12	Agitação
2	15	8	0.5	1	Agitação
3	10	8	1	12	Borbulhamento
4	10	12	1.5	12	Borbulhamento
5	5	10	1.5	48	Borbulhamento
6	15	12	1.5	48	Borbulhamento
7	15	8	1.5	1	Borbulhamento
8	5	8	1.5	48	Agitação
9	5	12	1	1	Borbulhamento
10	15	12	0.5	12	Agitação
11	15	8	1.5	12	Agitação
12	5	10	0.5	12	Agitação
13	5	8	0.5	48	Borbulhamento
14	5	10	1.5	1	Agitação
15	10	12	1	1	Agitação
16	10	10	1.5	1	Borbulhamento
17	15	10	1.5	48	Agitação
18	15	12	0.5	48	Agitação
19	10	10	1	48	Agitação
20	15	10	1	12	Borbulhamento
21	5	8	1	6	Agitação
22	5	12	1.5	48	Agitação
23	15	10	1	12	Borbulhamento
24	15	8	1.5	48	Borbulhamento
25	10	8	1	12	Borbulhamento
26	10	12	1.5	12	Borbulhamento
27	10	10	1	48	Agitação
28	10	12	0.5	48	Borbulhamento
29	15	8	0.5	48	Borbulhamento
30	10	10	0.5	1	Borbulhamento

## 3.2.2- Realização dos ensaios

### 3.2.2.1-Agitação Magnética

Nos ensaios com agitação magnética, colocou-se a massa de estrume e a massa de cinzas, adequados, num Erlenmeyer de 250 mL seguindo-se a adição de 150 mL de H<sub>2</sub>O, com pH adequado. A mistura foi agitada com barra magnética, em placa de agitação, durante o tempo de contacto adequado a cada ensaio. Após este período deixou-se decantar os sólidos não solubilizados e filtrou-se grosseiramente a fase líquida através de filtro de pano. A solução obtida foi armazenada em frasco de vidro e mantida refrigerada até posterior análise.

### 3.2.2.2-Borbulhamento

Nos ensaios com borbulhamento, colocou-se a massa de estrume e a massa de cinzas adequados, num Erlenmeyer de 250 mL, seguindo-se a adição de 150 mL de H<sub>2</sub>O, com pH adequado. Em cada Erlenmeyer foi colocada uma pipeta Pasteur ligada por um tubo de silicone a uma bomba de aquário, de modo a permitir o borbulhamento de ar atmosférico no meio, durante um período de tempo determinado, maximizando a sua agitação e promovendo a solubilização de compostos vários. No fim do tempo de borbulhamento adequado a cada ensaio, deixaram-se decantar os sólidos não solubilizados e filtrou-se a solução aquosa com filtro de pano para um recipiente de vidro. O filtrado foi mantido refrigerado até posterior análise.

A figura seguinte representa, a solução antes do pré-tratamento, após o pré-tratamento e após a filtração, respetivamente.



*Figura 9-Efluente antes do pré-tratamento, após o pré-tratamento e após filtração*

### 3.2.3- Caracterização do efluente após pré-tratamento

De modo a caracterizar o efluente após o pré-tratamento e filtração, foram efetuadas leituras da densidade ótica e do pH de todos os ensaios, como descrito em 2.2.6.2 e 2.2.6.3.

Foi também efetuada, a pesagem da massa de precipitado, a medição do volume de efluente e a análise de teor de sólidos totais, após filtração.

#### 3.2.3.1- Sólidos Totais (ST)

De modo a analisar o teor de sólidos totais, colocaram-se na estufa cadinhos, a  $\approx 105^{\circ}\text{C}$ , durante uma hora. Após esse período, os cadinhos foram colocados no exsicador e pesados assim que atingiram a temperatura ambiente. Seguidamente colocou-se, o volume de amostra adequado no respetivo cadinho e levou-se a um banho quente,  $\approx 95^{\circ}\text{C}$ , até evaporar todo o volume de amostra

colocado. Por último, os cadinhos foram colocados na estufa a  $\approx 105^\circ\text{C}$ , durante uma hora, de modo a garantir que toda a água presente na amostra era evaporada. Colocaram-se os cadinhos no exsicador e pesaram-se assim que atingiram a temperatura ambiente.

O teor de sólidos totais pode ser obtido através da equação 4

$$ST(g/L) = \frac{mfc - mic}{va} \times 1000$$

**(EQ.4)**

Onde,

mfc= massa final do cadinho (g)

mic=massa inicial cadinho (g)

va=volume de amostra (mL)

### 3.2.4-Utilização da microalga *Chorella vulgaris* para bioremediação do efluente

Duas condições utilizadas nos ensaios anteriores foram selecionadas para produzir uma quantidade de efluente suficiente para permitir a produção de microalgas. Pretendeu-se com este ensaio, avaliar de que forma as características finais do efluente influenciavam o crescimento das microalgas. Assim escolheram-se duas situações extremas: o ensaio nº 22, no qual se utilizou a maior massa de estrume e cinzas e o ensaio nº 18, no qual que utilizaram as menores massas de estrume e cinzas. Estes dois ensaios foram efetuados, de novo, ajustando a massa de estrume, massa de cinzas e volume de água adequado de modo a respeitar as proporções anteriormente testadas mas permitindo obter 1 L de efluente pré tratado, filtrado, como representa a tabela seguinte.

**Tabela 13**-Massa de cinzas, massa de estrume e volume água utilizados nos ensaios

<b>Reator nº</b>	<b>m estrume (g)</b>	<b>m cinzas (g)</b>	<b>Volume água (mL)</b>	<b>Tipo de agitação</b>
<b>18</b>	130	65	1957	Agitação magnética
<b>22</b>	391	587	1957	Agitação magnética

O efluente obtido nas condições do ensaio nº18, apresentava uma grande turbidez pelo que foi efetuada uma diluição de 1:3de forma a obter uma solução com um mínimo de permeabilidade da luz incidente.

Seguidamente procedeu-se á instalação dos reatores como descrito em 2.2.6.1 e à inoculação da microalga *C. vulgaris*, utilizando 30 mL da cultura mãe desta microalga.

### 3.3- Apresentação e Discussão dos Resultados

#### 3.3.1- Análise das Respostas obtidas pelo software Design Expert

Após realização dos ensaios previstos, de acordo com a Tabela 12 e avaliação dos parâmetros a testar foram colocados no software os resultados obtidos.

A Tabela 14 representa todas as variáveis/fatores e respostas/resultados (Desenho experimental).



**Tabela 14- Desenho experimental com todas as respostas obtidas**

Ensaio	Fatores					Respostas			
	A: Razão água/estrume	B: pH	C: Razão cinza/estrume	D: tempo contato	E: modalidade de agitação	d.o.	Massa precipitado(g)	Volume filtrado(mL)	Sólidos Totais(g/mL)
1	5	10	0.5	12	Agitação	0.45	13.2	125	0.016
2	15	8	0.5	1	Agitação	0.597	5.1	125	0.007
3	10	8	1	12	Borbulhamento	0.124	13.2	125	0.014
4	10	12	1.5	12	Borbulhamento	0.174	21.9	120	0.016
5	5	10	1.5	48	Borbulhamento	0.172	40.4	85	0.043
6	15	12	1.5	48	Borbulhamento	0.107	15.4	95	0.016
7	15	8	1.5	1	Borbulhamento	0.192	14.9	120	0.008
8	5	8	1.5	48	Agitação	0.607	43.7	90	0.046
9	5	12	1	1	Borbulhamento	0.684	27.8	120	0.016
10	15	12	0.5	12	Agitação	0.334	4	125	0.007
11	15	8	1.5	12	Agitação	0.385	11.5	120	0.013
12	5	10	0.5	12	Agitação	0.292	14.1	120	0.017
13	5	8	0.5	48	Borbulhamento	0.312	21	95	0.020
14	5	10	1.5	1	Agitação	0.092	54.3	90	-
15	10	12	1	1	Agitação	0.251	13.2	125	0.015
16	10	10	1.5	1	Borbulhamento	0.138	23.5	115	0.015
17	15	10	1.5	48	Agitação	0.607	13.2	80	0.019
18	15	12	0.5	48	Agitação	0.761	-	115	0.008
19	10	10	1	48	Agitação	0.607	19.7	105	0.019
20	15	10	1	12	Borbulhamento	0.606	8.3	135	0.011
21	5	8	1	6	Agitação	0.607	25.7	105	0.025
22	5	12	1.5	48	Agitação	0.607	56.5	85	0.041
23	15	10	1	12	Borbulhamento	0.257	9.1	130	0.007
24	15	8	1.5	48	Borbulhamento	0.068	16.8	100	0.017
25	10	8	1	12	Borbulhamento	0.124	12.7	125	0.013
26	10	12	1.5	12	Borbulhamento	0.152	21	115	0.018
27	10	10	1	48	Agitação	0.607	21.4	105	0.014
28	10	12	0.5	48	Borbulhamento	0.261	10.2	120	0.010
29	15	8	0.5	48	Borbulhamento	0.297	7.5	95	0.008
30	10	10	0.5	1	Borbulhamento	1.540	6.7	125	0.007

### 3.3.1.1- Densidade ótica ou absorvância

A metodologia envolvida no estabelecimento das equações das superfícies de resposta envolve o cálculo do valor da probabilidade  $p$  a partir do  $F$  estatístico, averiguando-se depois a significância do modelo, dos vários termos da equação e da falta de ajuste, com base no valor de  $p$ , considerando-se a existência de significância quando  $p < 0,05$ . No entanto a existência de não significância só se regista para valores de  $p > 0,1$ . A falta de ajuste é uma medida da qualidade do ajuste do modelo aos dados experimentais, sendo conveniente a ocorrência de uma falta de ajuste não significativa ( $p > 0,05$ ).

Na situação concreta da densidade ótica, o software sugeriu uma transformação para um modelo logarítmico, ao qual foram sendo sucessivamente retirados os termos que não influenciaram significativamente a densidade ótica (termos com  $p > 0,05$ ). Desta operação resulta um modelo logarítmico reduzido para descrever o ajuste aos dados experimentais, cujos parâmetros mais relevantes da análise de variância se encontram discriminados na Tabela 15.

**Tabela 15-** Parâmetros estatísticos da análise de variância (ANOVA)

	$F$	$p$	
Modelo	7,50	< 0,0001	Significativo
A – Razão água/estrume	0,22274	0,6386	
B – pH	0,0081	0,9290	
C – Razão cinza/estrume	26,36	< 0,0001	
D – Tempo de contato	0,0755	0,7863	
E – Tipo de agitação	0,2564	0,0142	
BE	6,05	0,0232	
CD	3,30	0,0843	
CE	5,55	0,0288	
DE	21,25	0,0002	
Falta de ajuste	2,33	0,1783	não significativo

$R^2 = 0.7715$ ,  $R^2$  ajustado = 0.6687,  $R^2$  previsto = 0,4771, Precisão adequada = 10,4689.

Pela análise dos resultados obtidos, verifica-se que a densidade ótica é fortemente afetada pelo razão cinza/estrume, pelo tipo de agitação e pela interação entre a Razão cinza/estrume e o tempo de contato.

A falta de ajuste não é significativa ( $p > 0,05$ ), sendo o significado do valor 0,1783, que existe 17,83% de hipóteses da ausência de falta de ajuste se dever ao ruído. O modelo é tanto melhor quanto maior o valor de p relativo á falta de ajuste.

A percentagem de variação na resposta explicada pelo modelo é representada pelo coeficiente  $R^2$ , o  $R^2$  ajustado resulta de um ajuste ao  $R^2$  tendo em conta o número de fatores e termos presentes no modelo. O coeficiente  $R^2$  previsto representa uma medida da qualidade do modelo para previsão de novas observações. A proximidade entre o  $R^2$  ajustado e o  $R^2$  previsto não deve ser superior a 0,2. A precisão adequada compara os valores previstos com o erro associado, não sendo desejável valores inferiores 4 (Mohamed, Masood, & Bhowmik, 2017)

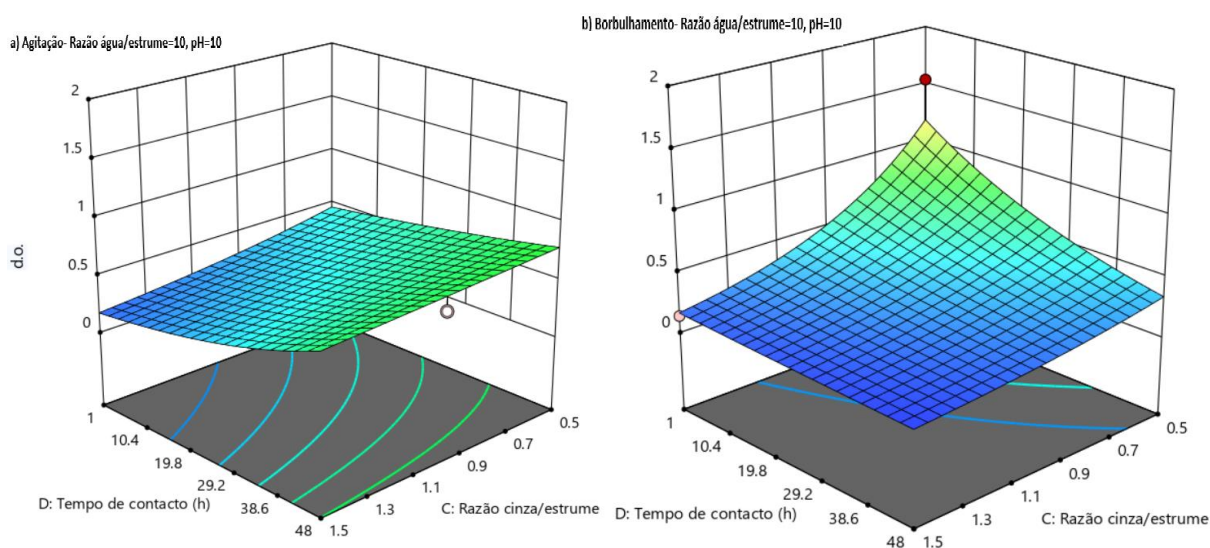
Os valores dos coeficientes de determinação  $R^2$ ,  $R^2$  ajustado e  $R^2$  previsto, apesar de não se encontrarem muito perto da unidade, são elevados, podendo conter alguma margem de erro na previsão para novas observações.

As equações do ajuste encontram-se na Tabela 16.

**Tabela 16-Equações geradas pelo software para o ajuste aos valores da densidade ótica**

Equação
<i>Agitação</i>
$\text{Log}_{10}(d.o.) = 0,342891 + 0,004231 \times A - 0,055259 \times B - 0,427657 \times C + 0,001101 \times D + 0,007677 \times A \times E$
<i>Borbulhamento</i>
$\text{Log}_{10}(d.o.) = -0,157864 + 0,004231 \times A + 0,059440 \times B - 0,864845 \times C - 0,015445 \times D + 0,007677 \times A \times E$

Na figura 17, encontram-se representadas as superfícies de resposta para densidade ótica em função da Razão cinza/estrume e do tempo de contato, tanto para agitação como para borbulhamento.



**Figura 10-Superfícies de resposta para a densidade ótica**

Através da observação das figuras pode-se concluir que para Agitação, a densidade ótica aumenta com a diminuição da Razão cinza/estrume e com o aumento do tempo de contato. Por outro lado, no caso do Borbulhamento, verifica-se que a densidade ótica aumenta com a diminuição do tempo de contato e Razão cinza estrume.

A diminuição da razão cinza:estrume reduz a coagulação de sólidos em suspensão, logo é expectável que se traduza num aumento da densidade. O aumento do tempo de contacto também poderia favorecer essas reações de precipitação e efetivamente isso acontece no regime de agitação por borbulhamento. No entanto, para o regime de agitação magnética, o aumento do tempo de contacto provocou um aumento da densidade ótica, o que pode dever-se a um aumento da fração solubilizada, uma vez que se trata de uma modalidade de agitação mais intensa.

### 3.3.1.2- Massa de precipitado

Relativamente á massa de precipitado, o software sugeriu, também, uma transformação para um modelo logarítmico, tendo-se procedido da mesma forma que para a densidade ótica (3.3.1.1). Neste caso verificou-se que a Razão água/estrume, a Razão cinza/estrume, o tempo de contato e as interações entre a Razão água/estrume e o pH, pH e Razão cinza/estrume e Razão cinza/estrume e tempo de contato afetam fortemente a massa de precipitado (Tabela 17). As equações do ajuste estão apresentadas na Tabela 18.

**Tabela 17-**Parâmetros estatísticos da análise de variância (ANOVA)

	<i>F</i>	<i>p</i>	
Modelo	155,25	< 0,0001	Significativo
A – Razão água/estrume	782,90	< 0,0001	
B – pH	0,0216	0,8850	
C – Razão cinza/estrume	679,46	< 0,0001	
D – Tempo de contato	36,08	< 0,0001	
E – Tipo de agitação	2,10	0,1669	
AB	3,98	0,0633	
AE	7,98	0,0122	
BC	6,31	0,0231	
CD	27,23	< 0,0001	
A <sup>2</sup>	6,20	0,0025	
C <sup>2</sup>	12,76	0,0006	
D <sup>2</sup>	18		
Falta de ajuste	3,55	0,0865	não significativo

$R^2 = 0.9915$ ,  $R^2$  ajustado = 0.9851,  $R^2$  previsto = 0.9691, Precisão adequada = 51,0277.

**Tabela 18**--Equações geradas pelo software para o ajuste aos valores da Massa de precipitado

Equação
<p><i>Agitação</i></p> $\begin{aligned} \text{Log}_{10}(\text{massa precipitado}) = & 1,15126 - 0,062852 \times A - \\ & 0,002669 \times B + 0,711015 \times C - 0,001701 \times D - 0,002207 \times A \times B + 0,025394 \times B \times C - \\ & 0,004352 \times C \times D + 0,001579 \times A^2 - 0,216443 \times C^2 + 0,000170 \times D^2 \end{aligned}$ <p><i>Borbulhamento</i></p> $\begin{aligned} \text{Log}_{10}(\text{massa precipitado}) = & 1,03530 - 0,053336 \times A - \\ & 0,002669 \times B + 0,711015 \times C - 0,001701 \times D - 0,002207 \times A \times B + 0,025394 \times B \times C - \\ & 0,004352 \times C \times D + 0,001579 \times A^2 - 0,216443 \times C^2 + 0,000170 \times D^2 \end{aligned}$

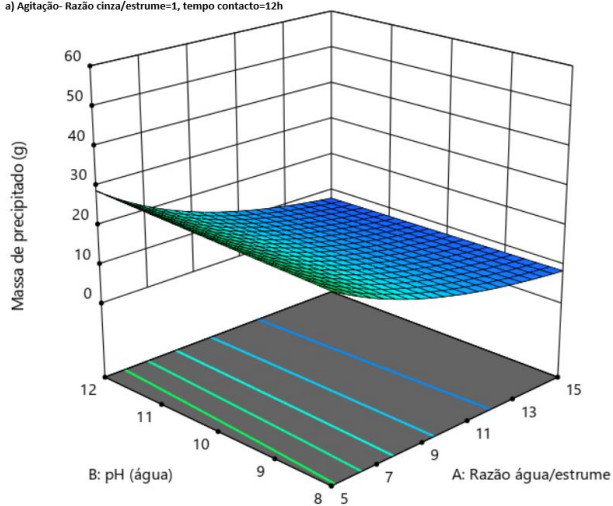
Pela análise da Figura 18 verifica-se que a massa de precipitado, tanto para agitação como para Borbulhamento, aumenta com a diminuição da Razão água/estrume, não sofrendo alteração com a mudança do pH da água, o que faz sentido, pois quanto menor a Razão água/estrume, maior a massa de estrume utilizada, e portanto maior a quantidade de fração não solúvel do estrume que contribui para a massa de precipitado.

O facto de não se encontrar uma correlação positiva ou negativa entre a massa de precipitado e o pH da água indica que os outros parâmetros estudados têm uma influência mais determinante neste resultado (massa de precipitado), sobrepondo-se a algum possível efeito do pH da água.

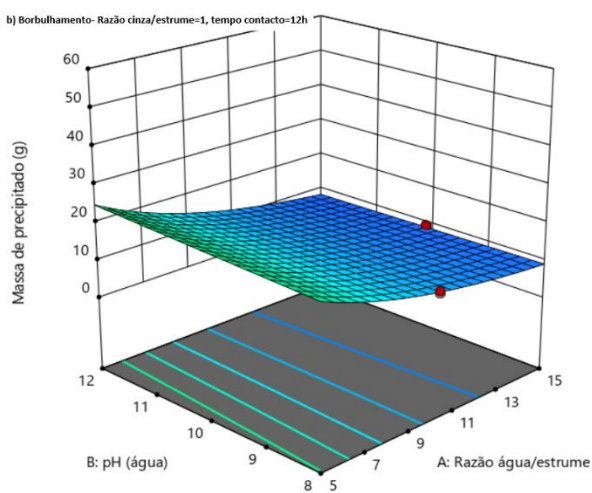
Verifica-se também que ao aumentar a Razão cinza/estrume, resulta, um aumento da massa de precipitado, sendo que o tempo de contato não a afeta significativamente. Este resultado está também de acordo com o efeito expectável do aumento do teor de cinzas que provocando maior coagulação provoca um aumento da fração precipitada. O tempo de contacto não afetou a massa de precipitado quando se variou a razão cinza/estrume, o que indica que na gama de tempos de contato

testados, a solubilização das cinzas é limitada por outros parâmetros como o volume de água disponível, e não pelo tempo de contacto.

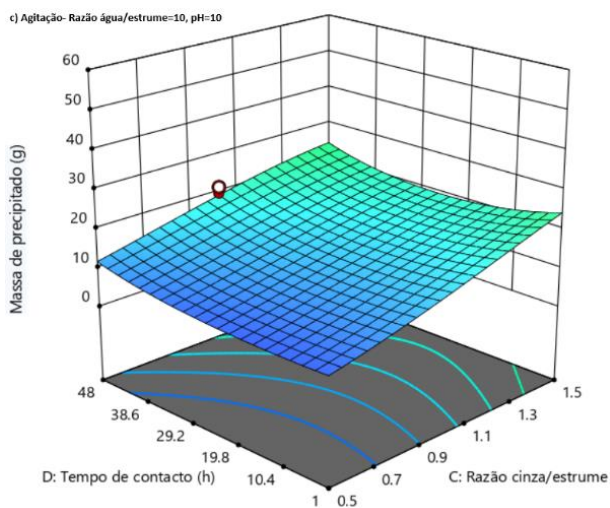
a) Agitação- Razão cinza/estrume=1, tempo contacto=12h



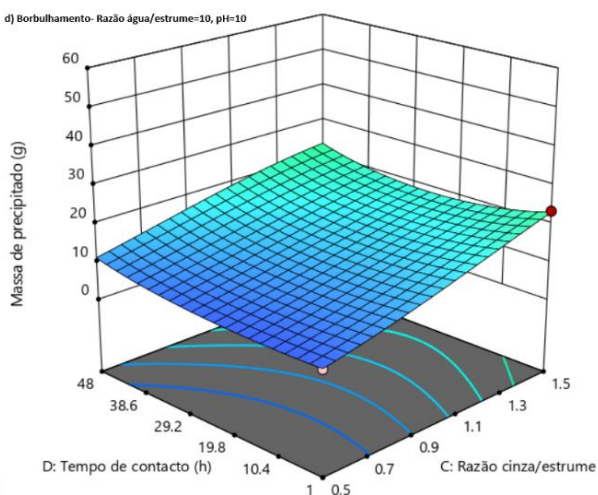
b) Borbulhamento- Razão cinza/estrume=1, tempo contacto=12h



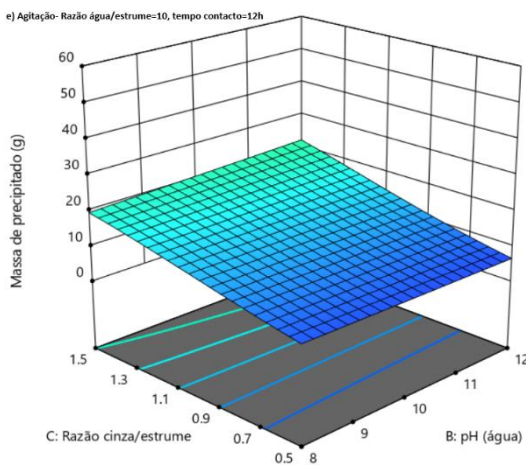
c) Agitação- Razão água/estrume=10, pH=10



d) Borbulhamento- Razão água/estrume=10, pH=10



e) Agitação- Razão água/estrume=10, tempo contacto=12h



f) Borbulhamento- Razão água/estrume=10, tempo contacto=12h

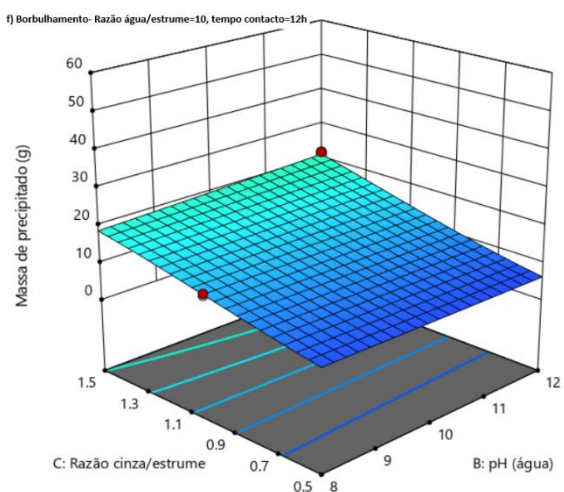


Figura 11-Superfícies de reposta para massa de precipitado



### 3.3.1.3- Volume de filtrado

Relativamente ao Volume de filtrado, o modelo foi obtido a partir de um modelo quadrático sugerido pelo software, da mesma forma que o descrito para o modelo da densidade ótica (3.3.1.1). Neste caso verificou-se que o Volume filtrado é significativamente afetado pela Razão cinza/estrume, pelo tempo de contato e pela interação entre o pH e a Razão cinza/estrume (Tabela 18). As equações do ajuste estão apresentadas na Tabela 19.

**Tabela 19-**Parâmetros estatísticos da análise de variância (ANOVA)

	<i>F</i>	<i>p</i>	
Modelo	21,55	< 0,0001	Significativo
A – Razão água/estrume	10,54	0,0051	
B – pH	4,50	0,0500	
C – Razão cinza/estrume	51,47	< 0,0001	
D – Tempo de contato	33,79	< 0,0001	
E – Tipo de agitação	4,70	0,0456	
AB	3,51	0,0795	
AD	7,01	0,0176	
BC	14,43	0,0016	
BE	3,14	0,0941	
CE	4,27	0,0555	
A <sup>2</sup>	5,62	0,0306	
C <sup>2</sup>	7,22	0,0162	
D <sup>2</sup>	12,62	0,0027	
Falta de ajuste	4,15	0,0640	não significativo

$R^2 = 0.9460$ ,  $R^2$  ajustado = 0.9021,  $R^2$  previsto = 0.8018, Precisão adequada = 15,5394.

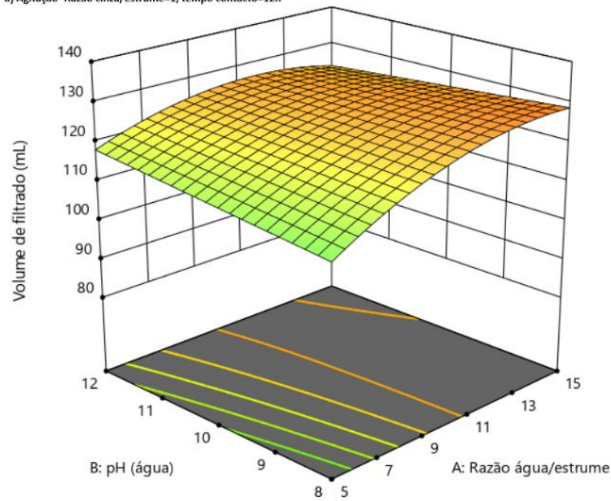
**Tabela 20-***Equações geradas pelo software para o ajuste aos valores do Volume de filtrado*

Equação
<i>Agitação</i>
$\begin{aligned} \text{Volume de filtrado} = & -0,920579 + 8,43446 \times A - 8,41789 \times B + 78,13069 \times C \\ & + 0,967458 \times D - 0,287316 \times A \times B - 0,029185 \times A \times D - 5,29335 \times B \times C - \\ & 0,203166 \times A^2 - 23,30167 \times C^2 - 0,020179 \times D^2 \end{aligned}$
<i>Borbulhamento</i>
$\begin{aligned} \text{Volume de filtrado} = & -28,19564 + 8,43446 \times A - \\ & 10,57213 \times B + 88,11093 \times C + 0,967458 \times D - 0,287316 \times A \times B - \\ & 0,029185 \times A \times D - 5,29335 \times B \times C - 0,203166 \times A^2 - 23,30167 \times C^2 - \\ & 0,020179 \times D^2 \end{aligned}$

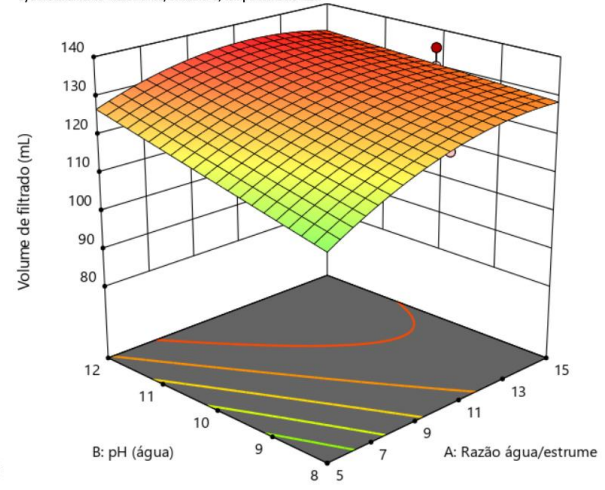
Pela análise da Figura 19 verifica-se que o volume de filtrado, para agitação e borbulhamento, aumenta com o aumento da Razão água/estrume, não sendo significativamente afetado pelo pH água, o que faz sentido pois ao aumentar a Razão água/estrume, diminui-se a massa de estrume a utilizar, o que faz com que exista uma maior diluição do estrume na água, aumentando assim o Volume de filtrado. Verifica-se, também que quanto maior a Razão água/estrume e menor o tempo de contato, maior será o Volume de Filtrado, tal fato acontece devido à menor massa de estrume utilizada, durante menos tempo, o que faz com que exista uma menor retenção de água na massa de precipitado, sendo possível recuperar quase todo o volume de água inicial introduzido.

É ainda possível verificar que o Volume de filtrado aumenta ao diminuir a Razão cinza/estrume, não existindo uma variação significativa com o aumento ou diminuição do pH da água, fato esse que faz sentido, pois ao diminuir a Razão cinza/estrume, diminui-se a massa de cinza utilizada, o que faz aumentar o Volume de filtrado.

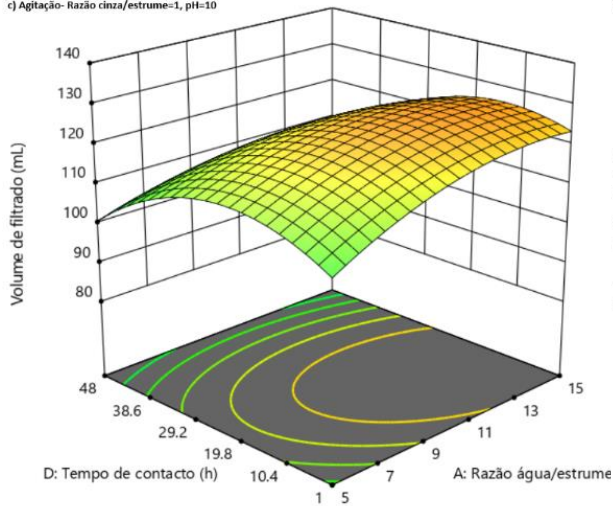
a) Agitação- Razão cinza/estrume=1, tempo contacto=12h



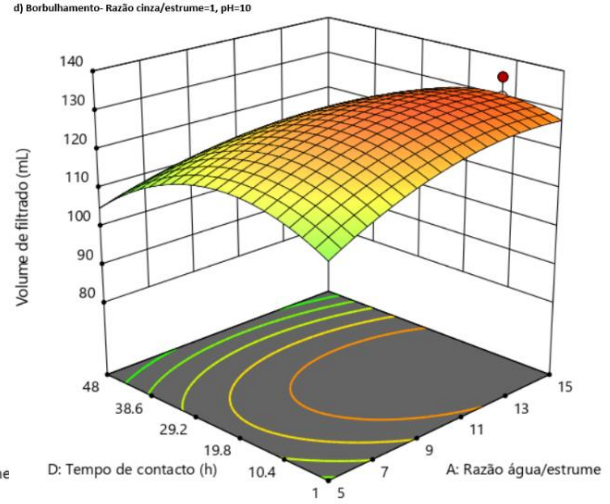
b) Borbulhamento- Razão cinza/estrume=1, tempo contacto=12h



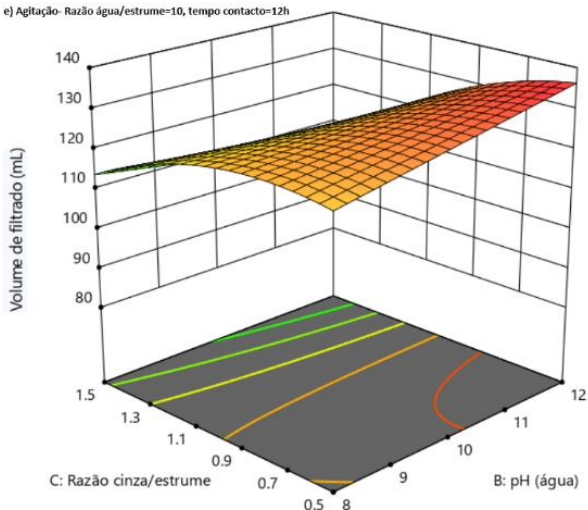
c) Agitação- Razão cinza/estrume=1, pH=10



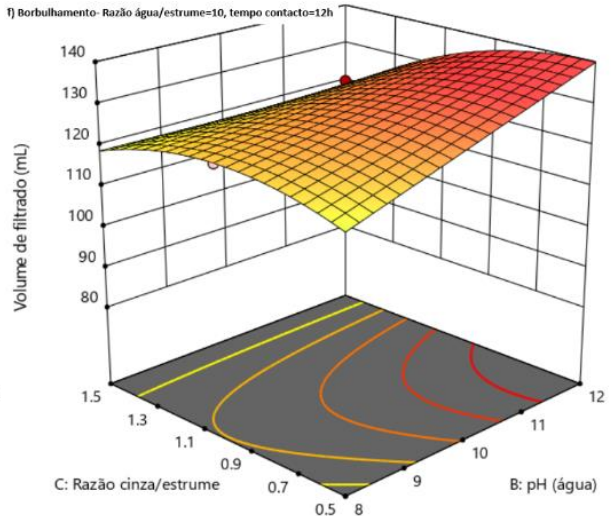
d) Borbulhamento- Razão cinza/estrume=1, pH=10



e) Agitação- Razão água/estrume=10, tempo contacto=12h



f) Borbulhamento- Razão água/estrume=10, tempo contacto=12h



**Figura 12-Superfícies de reposta para Volume de filtrado**

### 3.3.1.4-Sólidos Totais

Relativamente aos Sólidos Totais, o software sugeriu uma transformação para um modelo de “Raiz quadrada”, tendo-se procedido da mesma forma que para a densidade ótica (3.3.1.1). Neste caso verificou-se que os Sólidos Totais são significativamente afetados pela Razão água/estrume, pela Razão cinza/estrume, pelo tempo de contato e pelas interações entre a Razão água/estrume e a Razão cinza/estrume e entre a Razão cinza/estrume e o tempo de contato (Tabela 20). As equações do ajuste estão apresentadas na Tabela 21.

**Tabela 21-**Parâmetros estatísticos da análise de variância (ANOVA)

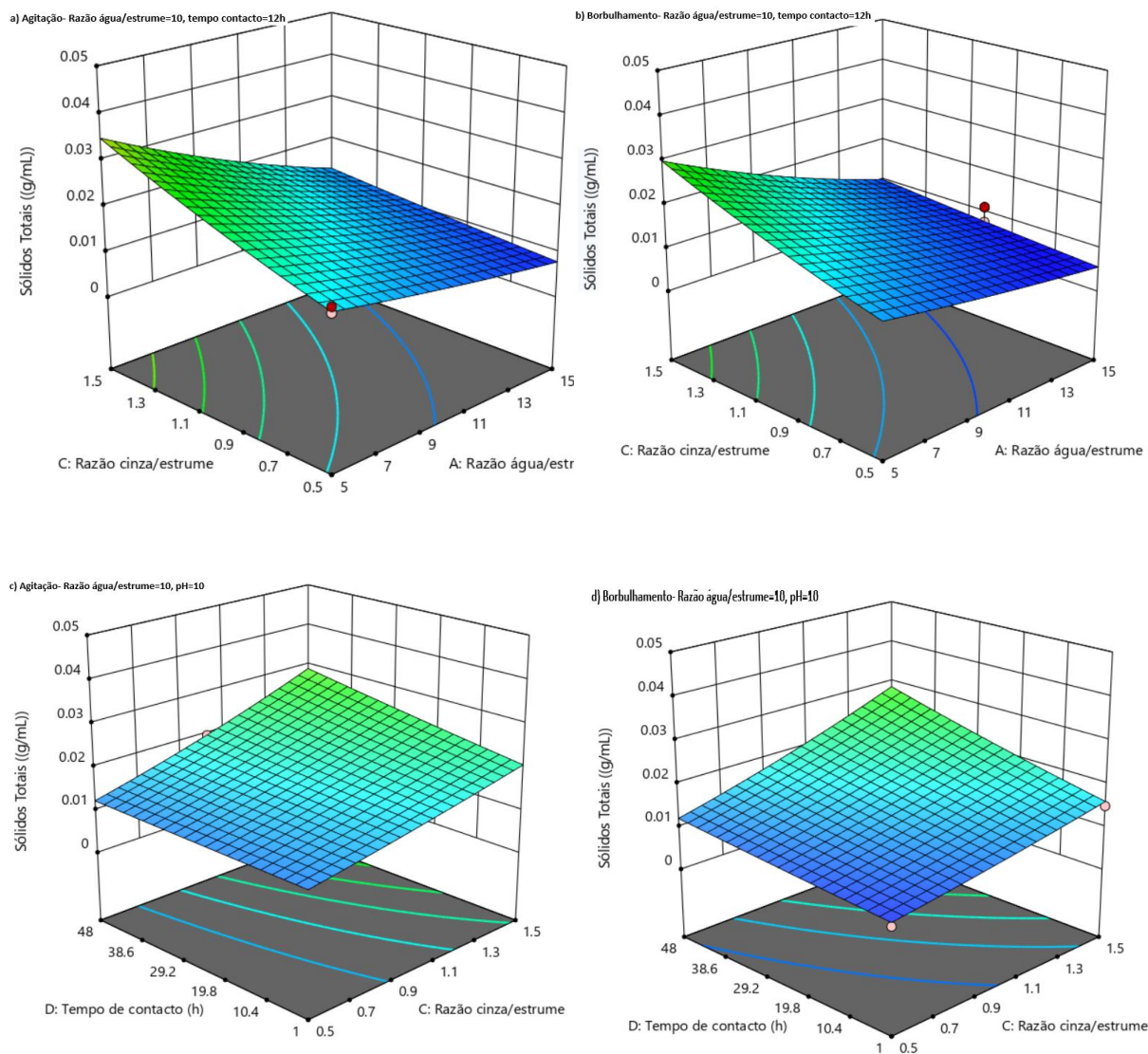
	<i>F</i>	<i>p</i>	
Modelo	79,47	< 0,0001	Significativo
A – Razão água/estrume	281,24	< 0,0001	
B – pH	5,02	0,0365	
C – Razão cinza/estrume	170,99	< 0,0001	
D – Tempo de contato	51,17	< 0,0001	
E – Tipo de agitação	9,73	0,0054	
AC	17,37	0,0005	
CD	8,91	0,0073	
DE	5,62	0,0279	
Falta de ajuste	0,5261	0,8460	não significativo

$R^2 = 0.9495$ ,  $R^2$  ajustado = 0.9573,  $R^2$  previsto = 0.9436, Precisão adequada = 31,5279.

**Tabela 22-Equações geradas pelo software para o ajuste aos valores dos Sólidos Totais**

Equação
<i>Agitação</i>
$v(\text{Sólidos Totais}) = 0,132579 - 0,002361 \times A - 0,001896 \times B + 0,068449 \times C - 0,000193 \times D - 0,0003299 \times A \times C - 0,029185 \times A \times D + 0,000508 \times C \times D$
<i>Borbulhamento</i>
$v(\text{Sólidos Totais}) = 0,115013 - 0,002361 \times A - 0,001896 \times B + 0,068449 \times C - 0,000153 \times D - 0,0003299 \times A \times C - 0,029185 \times A \times D + 0,000508 \times C \times D$

Pela análise da Figura 20 verifica-se que os Sólidos Totais, para o agitação e para o Borbulhamento, aumentam com a diminuição da Razão água/estrume e com o aumento da Razão cinza/estrume, o que faz sentido pois ao diminuir a Razão água/estrume e ao aumentar a Razão cinza/estrume, aumenta-se a massa de estrume e de cinzas a utilizar nos ensaios, aumentando assim a concentração de Sólidos Totais. Verifica-se, também, que o aumento do tempo de contato e o aumento da razão cinza estrume faz a concentração de Sólidos Totais aumentar. É interessante este resultado relativamente ao aumento da razão cinza:estrume pois confirma que apesar de as cinzas poderem contribuir para uma diminuição dos sólidos suspensos, provenientes do estrume, a sua solubilização parcial na solução aquosa traduz-se num aumento dos sólidos solúveis que compensa a diminuição dos sólidos suspensos de tal forma que se observa um aumento dos sólidos totais.

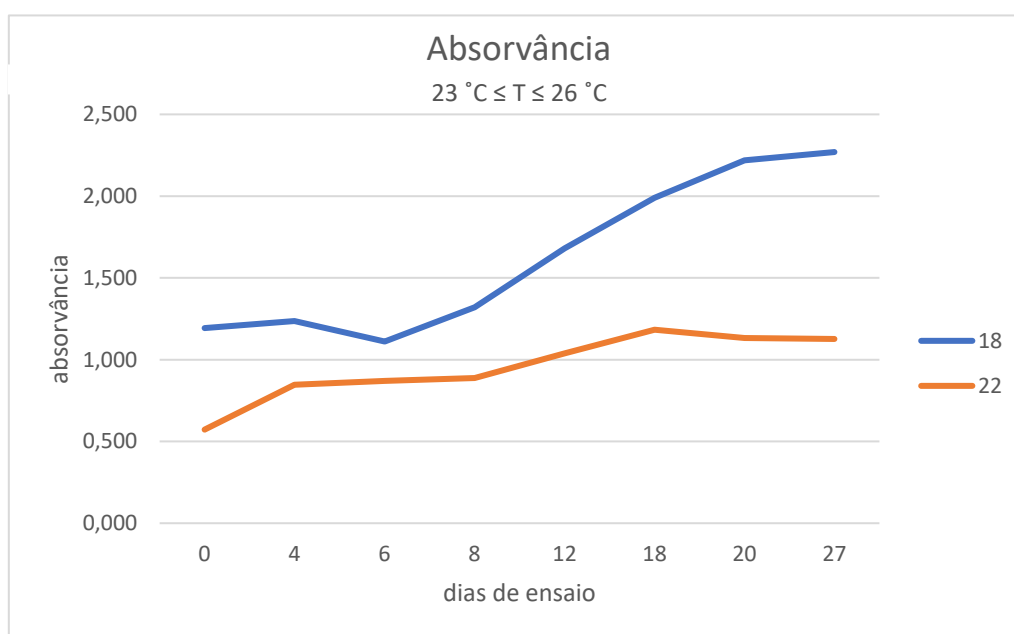


**Figura 13-** Superfícies de reposta para os Sólidos Totais

### 3.3.2- Crescimento de microalgas, pH e produção de biomassa algal

Foram instalados dois reatores como descrito em 2.2.6.1, correspondentes aos efluentes obtidos nas condições dos ensaios nºs 18 e 22. Para cada um deles, inoculou-se a microalga *C. vulgaris*, utilizando 30 mL da cultura mãe desta microalga.

O crescimento de microalgas foi controlado através da medição da densidade ótica como descrito em 2.2.6.2



**Figura 14**-Curvas de crescimento do Reator nº18 e nº 22 ao longo do ensaio

Através da análise das curvas de crescimento verifica-se a fase lag ou de arranque, durante os primeiros 6 a 8 dias de ensaio, seguindo-se a fase exponencial até aos 18 a 20 dias, após os quais a cultura entrou em fase estacionária até ao 27º dia de ensaio.

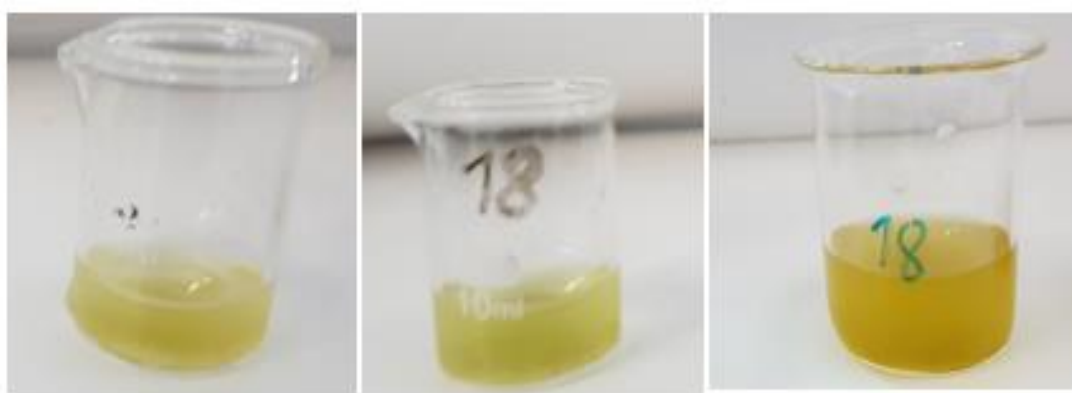
A curva de crescimento do reator 22 denota um desenvolvimento menor da cultura, traduzido por uma fase de lag mais extensa (até ao 8º dia) uma fase exponencial mais curta (até ao 18º dia) e caracterizada por um aumento muito moderado da densidade ótica, o que indica a não adaptação da cultura ao meio, comprovado também pela cor castanho escuro obtida no final do ensaio deste efluente como representado na figura 23.



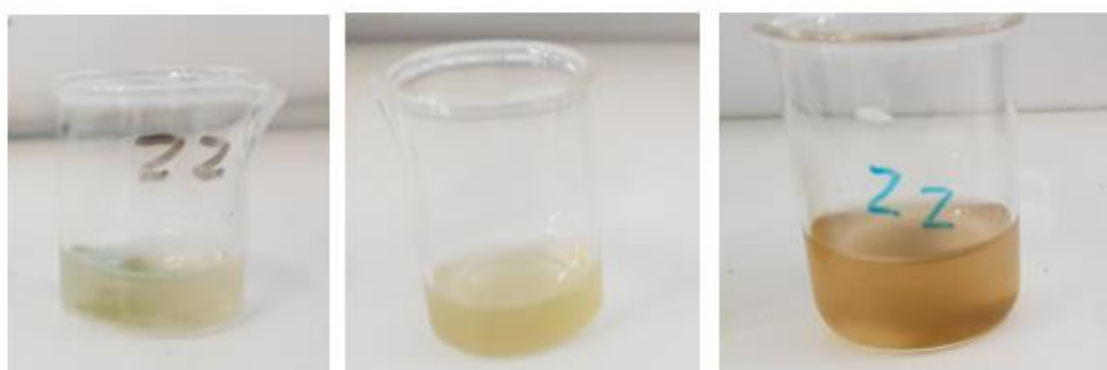
O crescimento da cultura de microalgas no reator 18 indica que as microalgas tiveram os nutrientes suficientes para o efeito.

O menor crescimento da cultura de microalgas *Chlorella vulgaris* e consequentemente a sua morte, no reator 22 deve-se, possivelmente, ao fato de ao utilizar muitas cinzas se ter provocado uma coagulação excessiva de nutrientes obtendo-se um efluente mais pobre e não se pode excluir a possibilidade de ocorrer um aumento da toxicidade do meio devida à dissolução de maiores quantidades de alguns componentes das cinzas (Sandoval R. et al, 2015).

O crescimento das curvas foi acompanhado de uma mudança significativa na cor de cada um dos efluentes como representam as figuras 22 e 23.



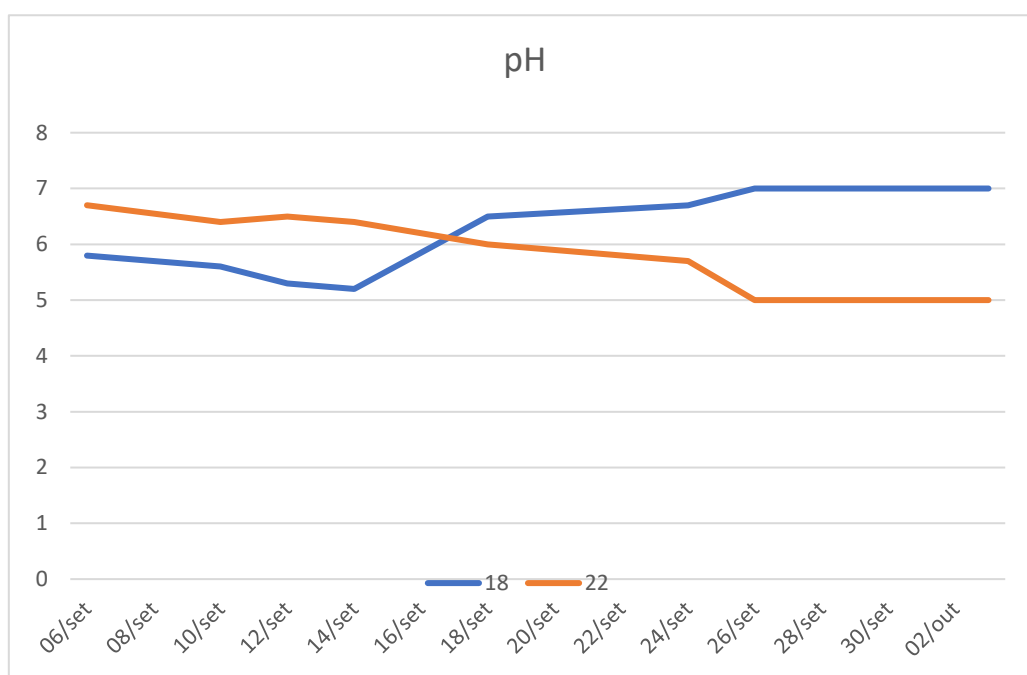
**Figura 15-**Evolução da cor do reator 18 ao longo do ensaio



**Figura 16-**Evolução da cor do reator 22 ao longo do ensaio



Durante este ensaio, além da medição da densidade ótica, mediu-se a temperatura ambiente do local onde estavam colocados os reatores. A temperatura medida variou entre os 23 °C e os 26 °C, encontrando-se dentro dos limites encontrados na literatura, sendo que geralmente, o valor ótimo deste parâmetro encontra-se entre 15 e 25 °C para a grande maioria de microalgas. Temperaturas muito elevadas ou muito reduzidas pode levar rapidamente ao declínio da taxa de crescimento (Larsdotter, 2006).



**Figura 17-**Evolução do pH do Reator 18 e 22 ao longo do ensaio

Como se pode observar pela análise das curvas de pH do Reator 18 e do Reator 22 a microalga *C. vulgaris* foi adaptando o pH do Reator 18 às suas necessidades, fazendo com que o pH do mesmo fosse aumentando até atingir um valor de pH=7. O inverso ocorreu com o Reator 22, tendo o pH diminuindo ao longo do ensaio, pois a cultura de microalgas não cresceu o suficiente para influenciar

o pH do meio. Para grande parte das espécies de microalgas, o pH deve manter-se entre 7 e 9 ((Barsanti et al, 2014).

A produção de biomassa obtida no final dos dois ensaios, a partir da análise do peso seco encontra-se representado na Tabela 23.

**Tabela 23-Produção e produtividade no final do ensaio**

	PRODUÇÃO (G/L)	PRODUTIVIDADE(G/L/DIA)
<b>REATOR Nº18</b>	2,13	0,08
<b>REATOR Nº22</b>	2,8	0,1

Apesar do crescimento da cultura de microalgas no Reator nº22 não ter sido bem sucedido, este reator apresenta uma maior produção e produtividade do que o Reator nº18, fator pode ser explicado, pelo fato de a medida de peso seco, sendo efetuada através de uma filtração, de uma pequena quantidade de efluente, previamente homogeneizada, e depois pesada, pode conter, não só microalgas “vivas” no respetivo efluente, como também microalgas “mortas” e partículas pertencentes ao próprio efluente.

A produtividade obtida encontra-se ainda longe dos resultados obtidos por outros autores, sendo que Lu, Wang, Wang e Yuan (2015), obtiveram produtividades de cerca de 0,26 g/L a partir de águas residuais de gado leiteiro, utilizando a espécie *Chlorella* (Lu, Wang, Wang, & Yuan, 2015).

Já Asmare, Demessie, e Murthy (2014) estudaram o crescimento da microalga *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus dimorphus* e uma co-cultura de ambas, em águas residuais de uma fábrica de produtos lácteos com diferentes diluições, 10 e 25 %, obtendo produções de 0,290-0,543 g/L, 0,145-0,364 g/L e 0,400-0,612 g/L para a *Scenedesmus dimorphus*, *Chlorella vulgaris* e co-cultura, respetivamente (Asmare, Demessie, & Murthy, 2014).

### 3.4-Conclusões

Neste ensaio foram estudados quais os parâmetros de entre, Razão águas/estrume, pH da água, Razão cinza/estrume, tempo de contato e tipo de agitação, que influenciam a densidade ótica, a massa de precipitado, o volume de filtrado e os Sólidos Totais. Verificou-se que para todos eles são significativamente afetados pela Razão cinza/estrume e pela Razão água/estrume. O volume de filtrado e a densidade ótica são também afetados largamente pelo tempo de contato.

Assim estudou-se o crescimento da cultura de microalgas *Chlorella vulgaris*, em dois reatores, a partir dos ensaios obtidos pelo Design Expert version 11, um deles com a menor Razão água/estrume e maior Razão cinzas/estrume, nº18, e outro com a maior Razão água/estrume e menor Razão cinzas/estrume, nº22, concluindo que a utilização de grandes quantidades de cinzas de biomassa utilizadas por forma a realizar um pré-tratamento, no reator nº 22, adicionaram uma grande toxicidade ao meio, o que acabou por resultar na morte da cultura.

## 4- Bioremediação de efluente de aviário com a microalga *Chlorella vulgaris* em regime descontínuo e semicontínuo

### 4.1-Introdução

A contínua procura de produtos alimentares de origem animal levou a que a pecuária industrial e a produção de aves fossem ganhando cada vez mais popularidade em todo o mundo, o que pode provocar grandes fontes de poluição. Apesar da alimentação animal à base de produtos concentrados, poder representar uma maior eficiência na produtividade de aves e um maior lucro, utilizando menos recursos, acarreta várias preocupações de poluição ambiental, representando riscos à saúde pública. Por outro lado, uma grande variedade de poluentes é excretada em conjunto com os resíduos animais, nomeadamente nutrientes, agentes patogénicos, hormonas naturais e sintéticas e metais pesados, que ao entrarem em contato com terrenos agrícolas, águas subterrâneas e superficiais representam riscos diretos e indiretos para a saúde humana. Os esforços para tratar os grandes volumes de adubos gerados com estrume devem ser melhorados (por exemplo, por digestores de biogás, sistemas agrícolas integrados, bioremediação por microalgas) de forma a minimizar os seus impactos no meio ambiente e na saúde humana. (Hu, Cheng, & Tao, 2017).

Com o aumento do consumo de carne à escala mundial, o número de animais abatidos para consumo e exportação aumentou de 2,5 milhões entre 2009-2010 para 3,5 milhões entre 2011-2012 (A. L. Singh, Jamal, Baba, & Islam, 2014).

Em Portugal, em 2017, a produção total de carne situou-se nas 889 mil toneladas, refletindo uma variação de -0,4%, quando comparada com a produção do ano 2016. Existiu uma diminuição de 4,4% do total de carne de reses (inclui bovinos, suínos, ovinos, caprinos e equídeos), enquanto a carne de animais de capoeira (inclui galináceos, perus e patos) apresentou um aumento de 5,3% (Instituto Nacional de Estatísticas, 2018).

Quando comparada com o ano 2016, a produção de carne de animais de capoeira registou um aumento global de 5,3%, tendo atingido as 389 mil toneladas, tendo a produção de frango alcançado 318 mil toneladas, com um acréscimo de 5,4%, consequência da maior produção nacional dos aviários de multiplicação e da importação de aves do dia. Os dados dos abates confirmaram o dinamismo da

atividade neste segmento, expresso pelo aumento do número de cabeças e sobretudo do volume, resultando num peso médio da carcaça de frango superior em cerca de 3%, relativamente a 2016 (Instituto Nacional de Estatísticas, 2018).

Os resíduos gerados na produção animal contêm matéria orgânica particulada e dissolvida, elevado número de componentes inorgânicos, bem como uma alta concentração de microrganismos patogénicos, todos de interesse na questão do seu impacte ambiental (Orrico Júnior et al., 2011).

A produção de frangos para abate gera um grande volume de resíduos na forma de estrumes, efluentes, camas e aves mortas. Estes resíduos possuem concentrações importantes de Azoto, fósforo, Potássio, minerais como o Cobre e o Zinco, além de uma alta carga de bactérias (Hachmann, Laureth, Parizotto, & Júnior, 2013).

A indústria de processamento de carne produz grandes volumes de Águas Residuais, provenientes do abate de animais e da limpeza das instalações do matadouro. Até 24% da água utilizada na indústria de alimentos e bebidas provém do processamento de carnes. A descarga direta de efluentes de matadouros não tratados para uma massa de água não é aconselhável devido à alta carga orgânica presente nestes efluentes. Assim é necessário recorrer-se a um tratamento adequado (Bustillo-Lecompte, Mehrvar, & Quiñones-Bolaños, 2016).

O efluente de aviário é composto por fezes, urina, sangue, fibra, gordura, carcaças e alimentos não digeridos nos intestinos dos animais abatidos, restos de produção e de limpeza das instalações. A sua composição varia de acordo com o processo industrial e carência de água. No entanto, este efluente, geralmente, contém altos níveis de carga orgânica e nutrientes. Os efluentes de matadouro são considerados prejudiciais devido à sua composição complexa de gorduras, proteínas e fibras, bem como à presença de elevada carga orgânica, nutrientes, microrganismos patogénicos e não patogénicos, detergentes e desinfetantes usados para atividades de limpeza e produtos farmacêuticos para uso veterinário. Assim, o tratamento e a eliminação de águas residuais de matadouro constituem uma necessidade económica e de saúde pública (Bustillo-Lecompte, Mehrvar, e Quiñones-Bolaños, 2016).

A Tabela 24 representa as características típicas dos efluentes de matadouros.

**Tabela 24**-caraterísticas típicas dos efluentes de matadouros (Bustillo-Lecompte, Mehrvar, e Quiñones-Bolaños, 2016).

Parâmetros	Limites	Comum
CBO(mg/L)	610-4635	1209
Ca(mg/L)	32-316	67
CQO(mg/L)	1250-15900	4221
K (mg/L)	0,01-100	90
Na (mg/L)	62-833	621
Pb (mg/L)	0,21-34	4
N total (mg/L)	50-841	427
Carbono orgânico total (mg/L)	100-1200	546
P Total (mg/L)	25-200	50
Sólidos Totais (mg/L)	300-2800	1164
pH	4,90-8,10	6,95

O tratamento deste tipo de efluentes pode ser efetuado através do crescimento de microalgas em fotobioreatores, como forma de remover a carga orgânica e inorgânica presente nos mesmos de forma a permitir a sua descarga em sistemas hídricos naturais.

(Markou, Iconomou, e Muylaert, (2016) estudaram o crescimento das microalgas *Chlorella vulgaris* e *Arthrospira platensis* em fotobioreatores alimentados com lixiviado de cama de frango. Foram utilizadas 4 diluições diferentes. A *Arthrospira platensis* apresentou taxas de produção de 83-114 mg/L e de produtividade de 191-199 mg/L/dia, enquanto que a *Chlorella vulgaris* obteve taxas de produção e produtividade de 1869 mg/L e 159-169 mg/L/dia, respetivamente. As taxas de remoção do Fósforo Total obtidas foram de 89% para a *Arthrospira platensis* e de 94,5 % para a *Chlorella vulgaris*. Na análise bioquímica final a *Chlorella vulgaris* apresentou teores de Proteína, Carbohidratos e Lípidos de 35%-38,8, 19-25,8 e 24,2-27,2%, respetivamente enquanto que a *Arthrospira platensis* apresentou valores de 32,7-39,5, 37,3-43,6 e 15,5-19,7 % para os teores de Proteína, Carbohidratos e Lípidos, respetivamente (Markou, Iconomou, & Muylaert, 2016).

M. Singh, Reynolds, e Das,( 2011) avaliaram a possibilidade de cultivar *Chlorella minutíssima*, *Chlorella sorokiniana*, *Scenedesmus bífuga* e uma cultura mista contendo as três microalgas, em digerido de cama de frango. Foram obtidas produções de 313-387 mg/L, 329-377 mg/L, 340-386 mg/L e 329-371 mg/L para *Chlorella sorokiniana*, *Scenedesmus bífuga*, *Chlorella minutíssima* e a cultura mista, respetivamente. Foi avaliada, também a composição química da biomassa algal final, apresentando valores de teor de proteínas de 37,9-39,2%, 37,3-39, 40,8-42,9% e 39,1-39,9% para *Chlorella sorokiniana*, *Scenedesmus bífuga*, *Chlorella minutíssima* e cultura mista, respetivamente. Já o conteúdo em lípidos obtido foi de 8,2-12,4%, 9,5-13,5%, 8,2-11,8% e 8,9-11,2% para *Chlorella sorokiniana*, *Scenedesmus bífuga*, *Chlorella minutíssima* e cultura mista, respetivamente. Os valores de carboidratos atingidos foram de 18,8-22,3%, 21,9-25,9%, 21-24,4% e 22,6-27,3% para *Chlorella sorokiniana*, *Scenedesmus bífuga*, *Chlorella minutíssima* e cultura mista, respetivamente (M. Singh, Reynolds, & Das, 2011).

## 4.2-Metodologia

### 4.2.1- Diferentes formas de efluente de aviário utilizado

Neste estudo foram utilizadas três formas de efluente de aviário diferentes:

-Efluente bruto;

-Efluente bruto filtrado: que correspondeu ao efluente bruto filtrado a vácuo, utilizando um filtro de gaze de modo a reter as gorduras de maior dimensão presentes no mesmo;

-Efluente bruto tratado: que correspondeu ao efluente bruto sujeito a um pré-tratamento com cinzas de biomassa antes de se proceder à filtração. Neste caso os sólidos eliminados na filtração não são só os pedaços de gordura de maior dimensão, mas também outros sólidos em suspensão que coagulam por reação com as cinzas. Após o tratamento com cinzas, o pH do efluente tornou-se bastante básico ( $\text{pH} \approx 14$ ) pelo que se efetuou um acerto de pH com  $\text{H}_2\text{SO}_4$  de modo a que este ficasse perto de neutro ( $\text{pH} \approx 7$ ).

### 4.2.2- Caracterização das diferentes formas de efluente de aviário

De modo a efetuar a caracterização físico-química das três formas de efluente de aviário descritos em 4.1, realizou-se um conjunto de análises de modo a determinar os seguintes parâmetros: Fósforo Total, Azoto Kjeldahl, nitritos, nitratos e CQO como descritos em 2.2.5.1; 2.2.5.2; 2.2.5.3; 2.2.5.4; 2.2.5.5, respetivamente.

### 4.2.3- Bioremediação do efluente bruto de aviário em regime descontínuo

#### 4.2.3.1- Instalação dos reatores para o crescimento da microalga *Chlorella vulgaris*

Procedeu-se à instalação dos reatores (4) como descrito em 2.7.1 e à inoculação da microalga *C. vulgaris*, utilizando 30 mL da cultura mãe desta microalga e um volume de efluente bruto adequado. A temperatura ambiente da sala, onde foram instalados os reatores, variou entre 19 °C e 21 °C. O ensaio teve a duração de 27 dias.



#### 4.2.3.2- Caracterização do efluente bruto

Durante o período em que foi realizado o ensaio em regime descontínuo, (27 dias), efetuou-se a medição da densidade ótica, como descrito em 2.7.2, de forma a analisar o crescimento da cultura de microalga *Chlorella vulgaris* em cada reator.

#### 4.2.4- Bioremediação do efluente bruto de aviário em regime semicontínuo 200 mL

##### 4.2.4.1- Instalação dos reatores para o crescimento da microalga *Chlorella vulgaris*

Após o ensaio em regime descontínuo, deu-se início ao ensaio em regime semicontínuo, utilizando os mesmos reatores descritos em 4.3, mas efetuando uma recombinação e redivisão do seu conteúdo de forma a partir de um estado o mais equivalente possível tanto em termos de densidade celular como de níveis de nutrientes. A temperatura ambiente da sala, onde foram instalados os reatores, variou entre 21 °C e 23 °C. O ensaio teve a duração de 11 dias.

##### 4.2.4.2- Caracterização do efluente bruto presente nos reatores

Durante este ensaio retiraram-se, diariamente, pela seguinte ordem:

- 200 mL de efluente do reator 4 para um recipiente, para futura análise;
- 200 mL do reator 3 foram transferidos para o reator 4;
- 200 mL do reator 2 foram transferidos para o reator 3;
- 200 mL do reator 1 foram transferidos para o reator 2;
- Ao reator 1 adicionou-se 200 mL de efluente bruto.

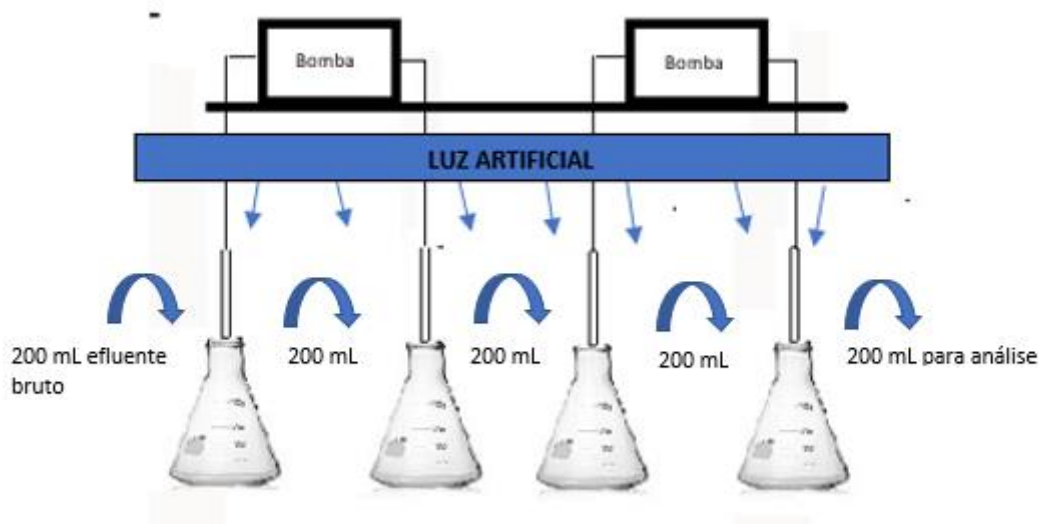
Este processo foi efetuado entre os dias 15 e 18 de Maio e entre 23 e 26 de Maio.

Seguidamente, procedeu-se à medição da densidade ótica, como descrito em 2.7.2 de todos os reatores, medindo o reator 1 antes e depois da adição de efluente bruto.

Retirou-se o volume necessário para analisar os sólidos suspensos totais, como descrito em 2.8.1, do reator 4, do dia 23 de Maio e do dia 29 de Maio.

No fim do ensaio, procedeu-se a filtração, a vácuo, utilizando um filtro de fibra de vidro de 47 mm de diâmetro, de metade do volume de cada amostra, de forma a avaliar as taxas de produção e produtividade. Efetuou-se a caracterização físico-química do efluente bioremediado, através da análise de Fósforo Total, Azoto Kjeldahl, nitritos, nitratos e CQO como descritos em 2.2.5.1; 2.2.5.2; 2.2.5.3; 2.2.5.4; 2.2.5.5, respetivamente, tanto das amostras filtradas como das não filtradas, de todos os dias.

A figura 25 representa, em esquema, a instalação real em sistema semicontínuo de 200 mL.



*Figura 18-Esquema da instalação em Regime Semicontínuo de 200mL*

## 4.2.5- Bioremediação do efluente bruto de aviário em regime semicontínuo de 150 mL

### 4.2.5.1- Instalação dos reatores para o crescimento da microalga *Chlorella vulgaris*

Para o ensaio em regime semicontínuo de 150 mL, reutilizaram-se os reatores do ensaio em regime semicontínuo de 75 mL, 4 reatores para o efluente bruto de aviário filtrado e 4 reatores para o efluente bruto de aviário filtrado tratado, de acordo com a Tabela 25.

**Tabela 25**-Identificação dos reatores

	Nº
Reatores efluente filtrado	1:1; 2:1; 3:1; 4:1
Reatores efluente filtrado e tratado	1:2; 2:2; 3:2; 4:2

Seguidamente deu-se início ao ensaio em regime semicontínuo de 150 mL. A temperatura ambiente da sala, onde foram instalados os reatores, variou entre 22 °C e 27 °C. O ensaio teve a duração de 11 dias.

#### 4.2.5.2- Caracterização do efluente bruto filtrado e do efluente bruto filtrado e tratado presente nos reatores

Durante este ensaio retiraram-se, diariamente, pela seguinte ordem:

##### Efluente bruto filtrado:

- 150 mL de efluente do reator 4:1 para um recipiente, para futura análise;
- 150 mL de efluente do reator 3:1 foram transferidos para o reator 4:1;
- 150 mL de efluente do reator 2:1 foram transferidos para o reator 3:1;
- 150 mL do de efluente reator 1:1 foram transferidos para o reator 2:1;
- Ao reator 1:1 adicionou-se 150 mL de efluente bruto filtrado.

##### Efluente bruto filtrado tratado:

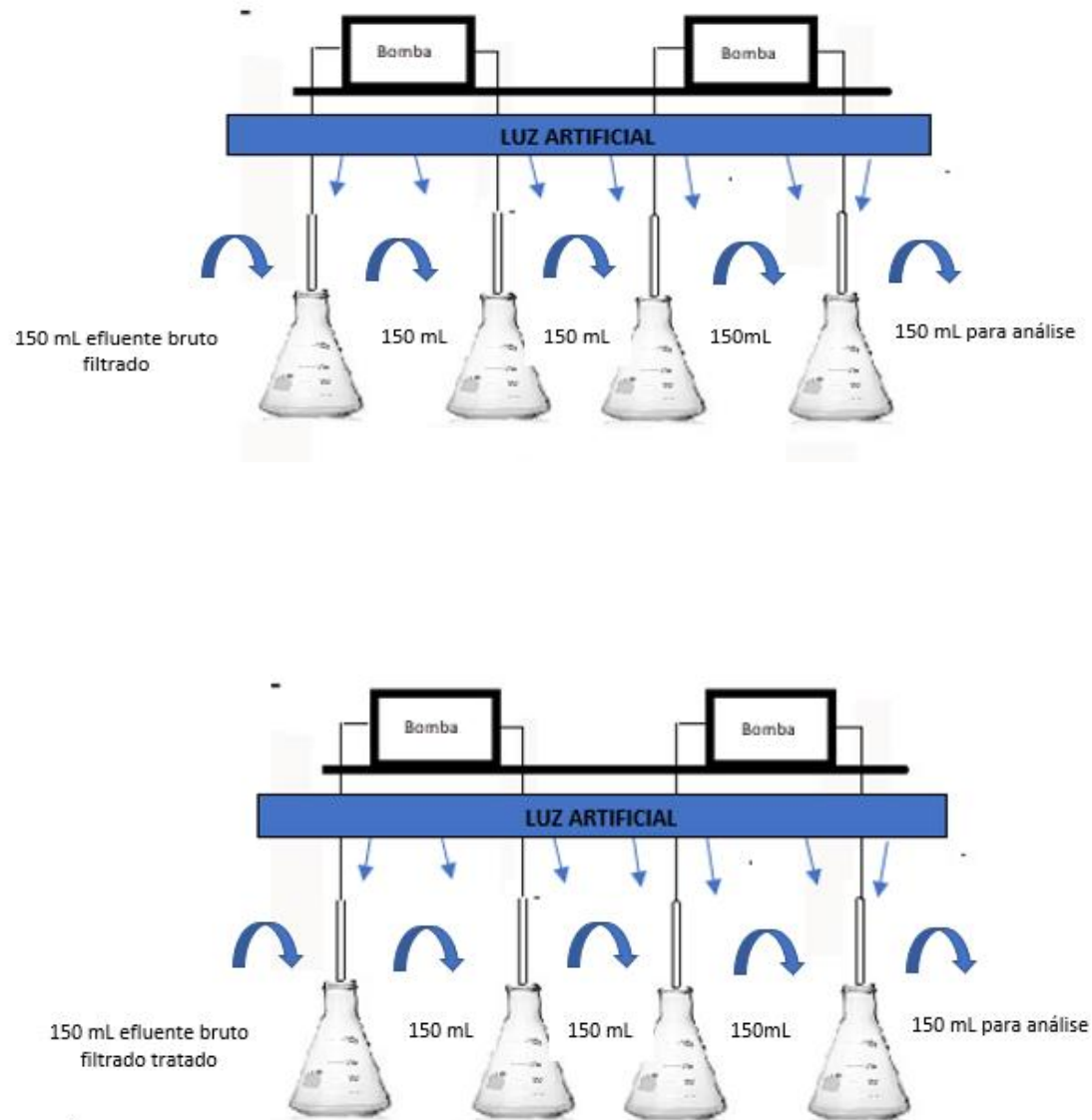
- 150 mL de efluente do reator 4:2 para um recipiente, para futura análise;
- 150 mL de efluente do reator 3:2 foram transferidos para o reator 4:2;
- 150 mL de efluente do reator 2:2 foram transferidos para o reator 3:2;
- 150 mL do de efluente reator 1:2 foram transferidos para o reator 2:2;
- Ao reator 1:2 adicionou-se 150 mL de efluente bruto filtrado tratado.

Este processo foi efetuado entre os dias 18 de Junho e 29 de Junho.

Seguidamente, procedeu-se á medição da densidade ótica e do pH como descrito em 2.7.2 e 2.7.3, respetivamente, de todos os reatores, medindo o reator 1:1 e 1:2 antes e depois da adição de efluente bruto filtrado e de efluente bruto filtrado tratado, respetivamente.

Retirou-se o volume necessário para analisar os sólidos suspensos totais, como descrito em 2.8.1, do reator 4, dos dias 18, 21, 25, 27, 29 de Junho, do efluente bruto filtrado e do efluente bruto filtrado tratado.

No fim do ensaio, procedeu-se á filtração, a vácuo, utilizando um filtro de fibra de vidro de 47 mm de diâmetro, de um volume de cada amostra adequado à determinação das taxas de produção e produtividade. Efetuou-se a caracterização físico-química, através da análise de fósforo Total, azoto Kjeldahl, nitritos, nitratos e CQO como descritos em 2.2.5.1; 2.2.5.2; 2.2.5.3; 2.2.5.4; 2.2.5.5, respetivamente, tanto das amostras de efluente bruto filtrado como das de efluente bruto filtrado tratado, de todos os dias.



**Figura 19**-Esquema da instalação em Regime Semicontínuo de 150mL do efluente bruto filtrado e efluente bruto filtrado tratado

## 4.2.6- Bioremediação do efluente bruto de aviário em regime semicontínuo de 75 mL

### 4.2.6.1- Instalação dos reatores para o crescimento da microalga *Chlorella vulgaris*

Após o ensaio em regime semicontínuo de 200 mL, recombina-se os 4 reatores, dentro de um balão volumétrico de 10L, ao qual se adicionou 4L H<sub>2</sub>O fervida, de modo a efetuar uma diluição de 1:2 e dividiu-se o conteúdo do balão volumétrico em 8 reatores de 1L. Os reatores foram então identificados de acordo com o efluente a utilizar, 4 reatores para o efluente bruto de aviário filtrado e 4 reatores para o efluente bruto filtrado tratado, de acordo com a Tabela 26.

**Tabela 26**-Identificação dos reatores

	Nº
Reatores efluente filtrado	1:1; 2:1; 3:1; 4:1
Reatores efluente filtrado e tratado	1:2; 2:2; 3:2; 4:2

Seguidamente deu-se início ao ensaio em regime semicontínuo de 75 mL. A temperatura ambiente da sala, onde foram instalados os reatores, variou entre 22 °C e 23 °C. O ensaio teve a duração de 11 dias.

#### 4.2.6.2- Caracterização do efluente bruto filtrado e do efluente bruto filtrado e tratado presente nos reatores

Durante este ensaio retiraram-se, diariamente, pela seguinte ordem:

##### Efluente bruto filtrado:

- 75 mL de efluente do reator 4:1 para um recipiente, para futura análise;
- 75 mL de efluente do reator 3:1 foram transferidos para o reator 4:1;
- 75 mL de efluente do reator 2:1 foram transferidos para o reator 3:1;
- 75 mL do de efluente reator 1:1 foram transferidos para o reator 2:1;
- Ao reator 1:1 adicionou-se 75 mL de efluente bruto filtrado.

##### Efluente bruto filtrado tratado:

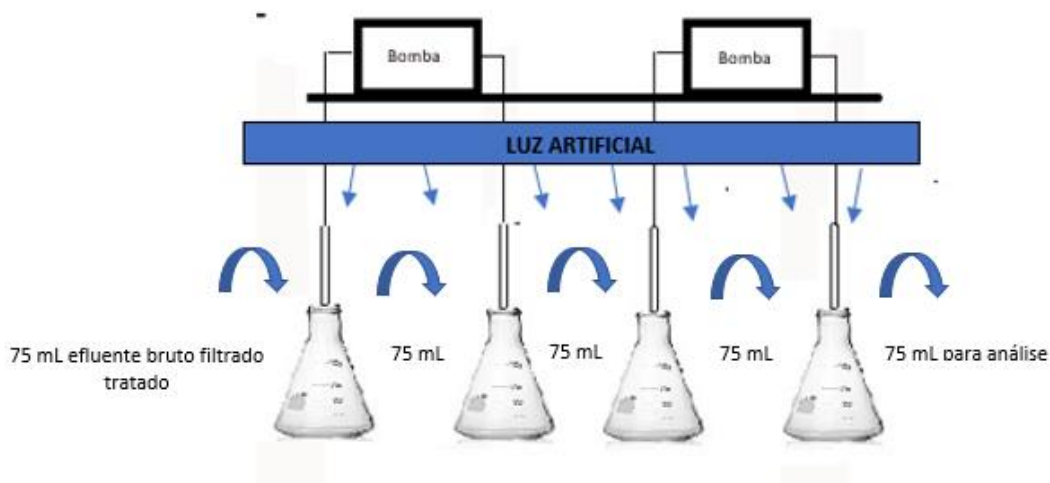
- 75 mL de efluente do reator 4:2 para um recipiente, para futura análise;
- 75 mL de efluente do reator 3:2 foram transferidos para o reator 4:2;
- 75 mL de efluente do reator 2:2 foram transferidos para o reator 3:2;
- 75 mL do de efluente reator 1:2 foram transferidos para o reator 2:2;
- Ao reator 1:2 adicionou-se 75 mL de efluente bruto filtrado tratado.

Este processo foi efetuado entre os dias 28 de Maio e 7 de Junho.

Seguidamente, procedeu-se á medição da densidade ótica e do pH como descrito em 2.2.6.2 e 2.2.6.3, respetivamente, de todos os reatores, medindo o reator 1:1 e 1:2 antes e depois da adição de efluente bruto filtrado e de efluente bruto filtrado tratado, respetivamente.

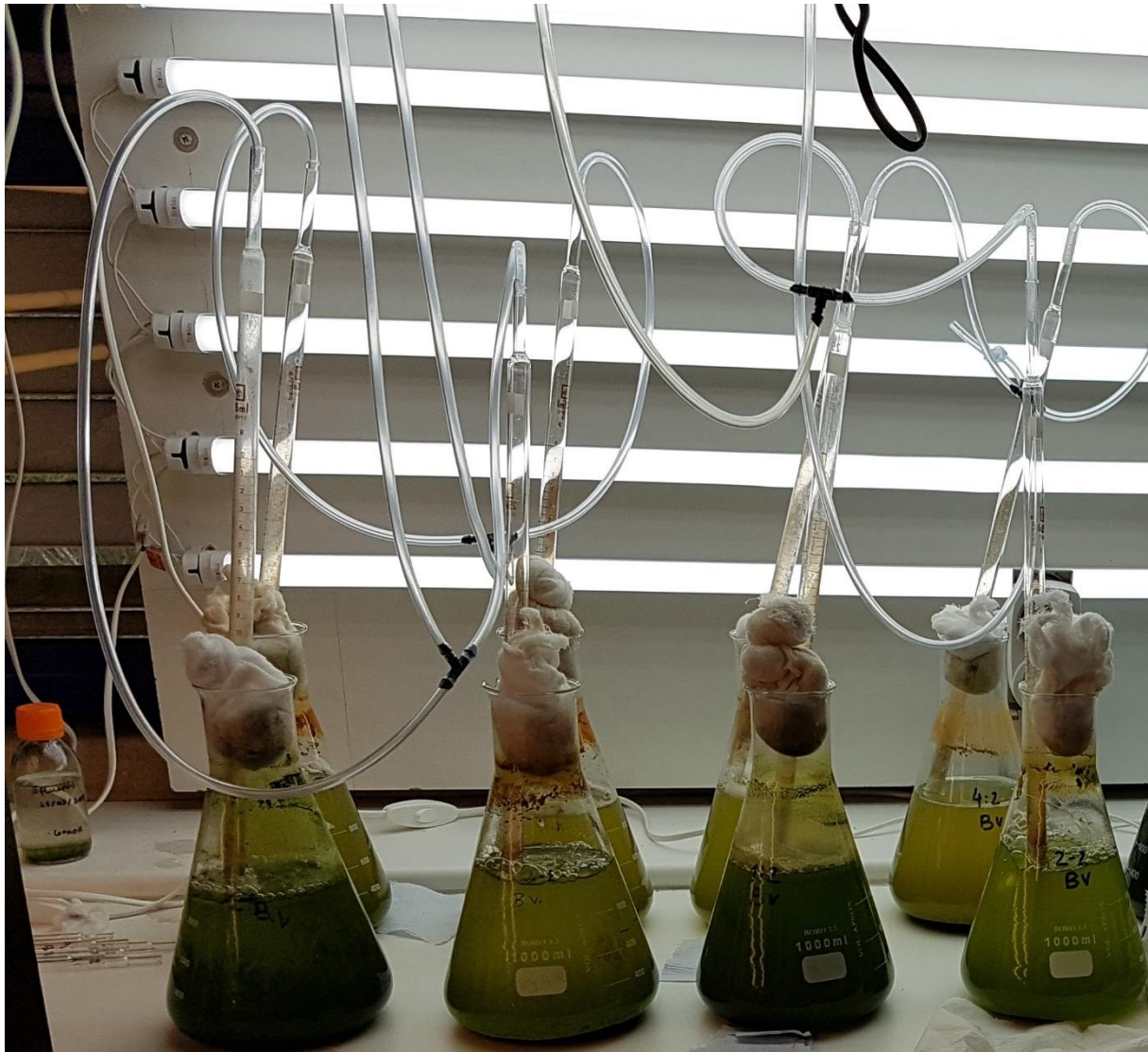
Retirou-se o volume necessário para analisar os sólidos suspensos totais, como descrito em 2.8.1, do reator 4, dos dias 30 de Maio e dos dias 1, 4, 6, 8 de Junho, do efluente bruto filtrado e do efluente bruto filtrado tratado.

No fim do ensaio, procedeu-se á filtração, a vácuo, utilizando um filtro de fibra de vidro de 47 mm de diâmetro, do volume de cada amostra. Efetuou-se a caraterização físico-química, através da análise de fósforo Total, azoto Kjeldahl, nitritos, nitratos e CQO como descritos em 2.2.5.1; 2.2.5.2; 2.2.5.3; 2.2.5.4; 2.2.5.5, respetivamente, tanto das amostras de efluente bruto filtrado como dase de efluente bruto filtrado tratado de todos os dias.



**Figura 20**-Esquema da instalação em Regime Semicontínuo de 75mL do efluente bruto filtrado tratado





*Figura 21-Instalação Real*

#### 4.2.7-Caraterização final da biomassa algal após os ensaios de bioremediação

Após a etapa de bioremediação, foi efetuada a centrifugação (Sigma) do meio de cultura, a 5000 rpm durante 5 minutos, de modo a separar a biomassa algal do efluente já tratado. A biomassa algal foi depois transferida para caixas de Petri, e colocada, a secar, durante cerca de 24h, a 50 °C. Após secagem, transferiu-se a biomassa algal seca para um recipiente onde se utilizou um almofariz de modo a quebrar a ligações celulares, de forma a obter-se uma maior recuperação de lípidos. Este processo foi efetuado para a biomassa algal proveniente de cada um dos reatores.

##### 4.2.7.2-Lípidos

Para a extração de lípidos, colocou-se a biomassa algal, previamente moída, num cartucho de papel selado em todos os lados exceto num e introduzido num extrator Soxhlet, na base do qual foi colocado um balão de fundo redondo com o volume indicado de éter de petróleo, colocando-se depois, numa manta de aquecimento. No final da extração, filtrou-se o solvente contendo o óleo para um balão de evaporação, previamente tarado, levando-o ao Rotavapor (BÜCHI-R-200), de forma a separar o solvente do óleo. Por fim, colocou-se o balão, contendo o óleo, na estufa a 105°C, de modo a evaporar quaisquer vestígios de solvente. Retirou-se o balão da estufa, colocou-se no exsiccado, até este atingir a temperatura ambiente e pesou-se.

##### 4.2.7.3-Proteínas

Para a obtenção das proteínas foi determinado azoto Kjeldahl como descrito em 2.2.5.2 e o cálculo das proteínas foi efetuado de acordo com a seguinte equação:

$$\%Proteína = \frac{v_1 \times N \times V_B}{v_2 \times m_1} \times 1,4 \times 6,25$$

(EQ.5)

Onde,

$v_1$  = Volume ácido sulfúrico gasto na titulação do destilado (mL)

$v_2$  = Volume de amostra digerida utilizada na destilação (mL)

$V_B$  = Volume balão volumétrico utilizado na digestão (mL)

N = Normalidade do titulante (N)

$m_1$  = massa de amostra utilizada na digestão (g)

6,25 = fator de conversão de azoto em proteína

#### 4.2.7.4-Açúcares Totais e Cinzas

Os açúcares totais + Cinzas foram obtidos através da seguinte equação:

$$A_T + C = (100 - (P - L))$$

**(EQ.6)**

Onde,

$A_T$  = Açúcares Totais

$P$  = Proteínas

$L$  = Lípidos

$C$  = Cinzas

## 4.3-Apresentação e Discussão dos Resultados

### 4.3.1-Bioremediação do efluente de Aviário

A bioremediação do efluente de aviário foi estudada em três ensaios semicontínuos nos quais diferentes volumes de efluente foram transferidos entre reatores com culturas estabilizadas.

Esta etapa irá dividir-se em três fases, começando pela discussão do ensaio semicontínuo onde se efetuaram transferências de 200 mL de efluente, seguindo-se o ensaio de transferência de 150 mL de efluente, terminando com o ensaio de transferência de 75 mL de efluente.

Os parâmetros estudados foram o crescimento da microalga *Chlorella vulgaris*, através da medição da densidade ótica como descrito em 2.2.6.2, a respetiva produção de biomassa algal, bem como a evolução do pH e da temperatura ambiente durante o período de realização dos ensaios.

Por fim, discutir-se-ão os resultados da caracterização físico-química (Fósforo Total, Azoto Kjeldahl, nitritos, nitratos e CQO), antes e depois da biorremediação dos efluentes usados neste estudo como referido em 2.2.5.1; 2.2.5.2; 2.2.5.3; 2.2.5.4; 2.2.5.5, respetivamente.

#### 4.3.1.1-Caraterização dos efluentes utilizados nos ensaios

Ao longo dos ensaios foi utilizado efluente bruto, efluente bruto filtrado e efluente bruto filtrado tratado. Os parâmetros selecionados para a caracterização físico-química de cada um deles encontram-se na Tabela 27.

*Tabela 27-Caraterização dos efluentes utilizados*

	Fósforo Total	Azoto Kjeldahl	CQO
	mg/L	mg/L	mg O2/L
<b>efluente bruto</b>	45,0	270,0	4423,1
<b>efluente bruto filtrado(não tratado)</b>	41,4	264,6	2115,4
<b>efluente tratado</b>	4,3	248,0	2500,0

O efluente avícola bruto apresenta uma CQO superior a 4400 mg O<sub>2</sub>/L, o que denota a presença de uma grande quantidade de compostos que terão que ser removidos por tratamento ou remediação adequados, antes que este efluente possa ser descarregado no meio ambiente (Bustillo-Lecompte, Mehrvar, e Quiñones-Bolaños, 2016).

O processo de filtração permite remover componentes em suspensão que contribuem para os teores de fósforo e azoto mas que sobretudo contribuem para a CQO. A filtração causou uma redução de 8% no teor de fósforo, uma redução de 2% no teor de azoto e uma redução de 52% na CQO. Alguns sólidos suspensos que contribuem para a CQO mas que não afetam significativamente os teores de fósforo ou azoto são os lípidos e partículas das penas, ossos e outras componentes sólidas dos resíduos.

O efluente tratado com cinzas e filtrado apresenta grande redução do Fósforo Total, moderada redução do azoto Kjeldhal e um aumento da CQO. A redução do fósforo total relativamente ao efluente filtrado indica que o fósforo se encontra em formas solúveis que podem reagir com as cinzas ou sob a forma de sólidos suspensos que são arrastados no processo de coagulação. O fósforo pode ser um componente de nanopartículas ou micropartículas de bicos, ossos, e outros componentes sólidos, que são suficientemente pequenas para passar para o efluente filtrado mas que são arrastadas para o precipitado durante o tratamento com cinzas.

Na Tabela 28 encontram-se as características de efluentes de matadouro

**Tabela 28**-Características de efluentes de matadouro  
(Bustillo-Lecompte, Mehrvar, e Quiñones-Bolaños, 2016)

Parâmetro	Limites	Comum
CQO(mg/L)	1250-15900	4221
CBO(mg/L)	610-4635	1209
Azoto Total (mg/L)	50-841	427
Fósforo Total(mg/L)	25-200	50

O efluente bruto utilizado neste estudo encontra-se dentro dos valores referidos na literatura para efluentes de matadouro. No entanto, os processos de pré-tratamento efetuados reduzem os nutrientes presentes no efluente, Fósforo Total e Azoto Kjeldahl, bem como a carga orgânica, reduzindo a CQO.

#### 4.3.1.2- Nitratos e Nitritos

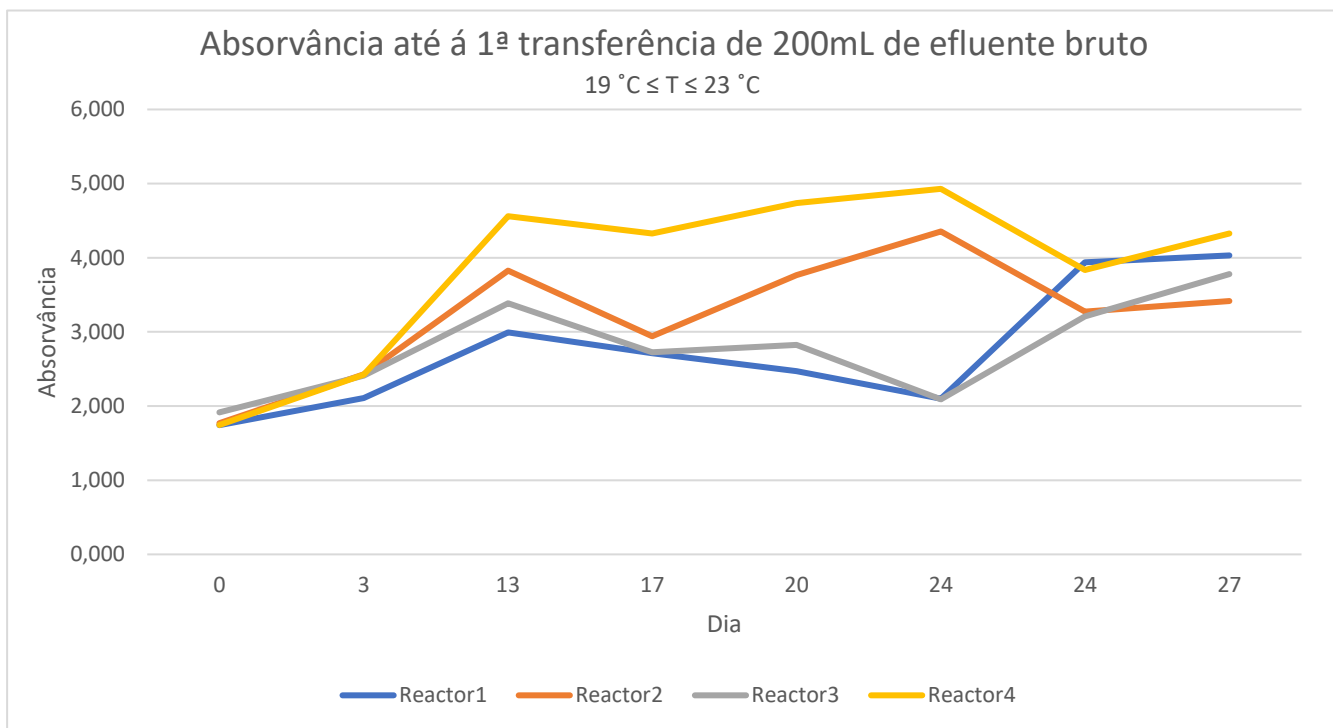
De modo a obter os valores de nitritos e nitratos de todas as amostras utilizadas nos três ensaios em regime semi-contínuo (200mL;150mL;75mL), bem como do efluente bruto, efluente bruto filtrado e efluente bruto filtrado tratado, foi seguido o protocolo como referido em 2. 2.5.3 e 2.2.5.4, respetivamente. No entanto, nenhuma das amostras apresentou resultados positivos quanto a esses parâmetros.

#### 4.3.2- Ensaio semicontínuo com transferência de 200 mL de efluente

##### 4.3.2.1- Crescimento de microalgas, temperatura e produção de biomassa algal

Foram instalados quatro reatores como descrito em 2.2.6.1, cada um deles correspondendo ao 1, 2, 3, 4. Para cada um deles, inoculou-se a microalga *Chlorella vulgaris*, utilizando 30mL da cultura mãe desta microalga em 1L de efluente bruto.

O crescimento de microalgas foi controlado através da medição da densidade ótica ou absorvância, como descrito em 2.2.6.2

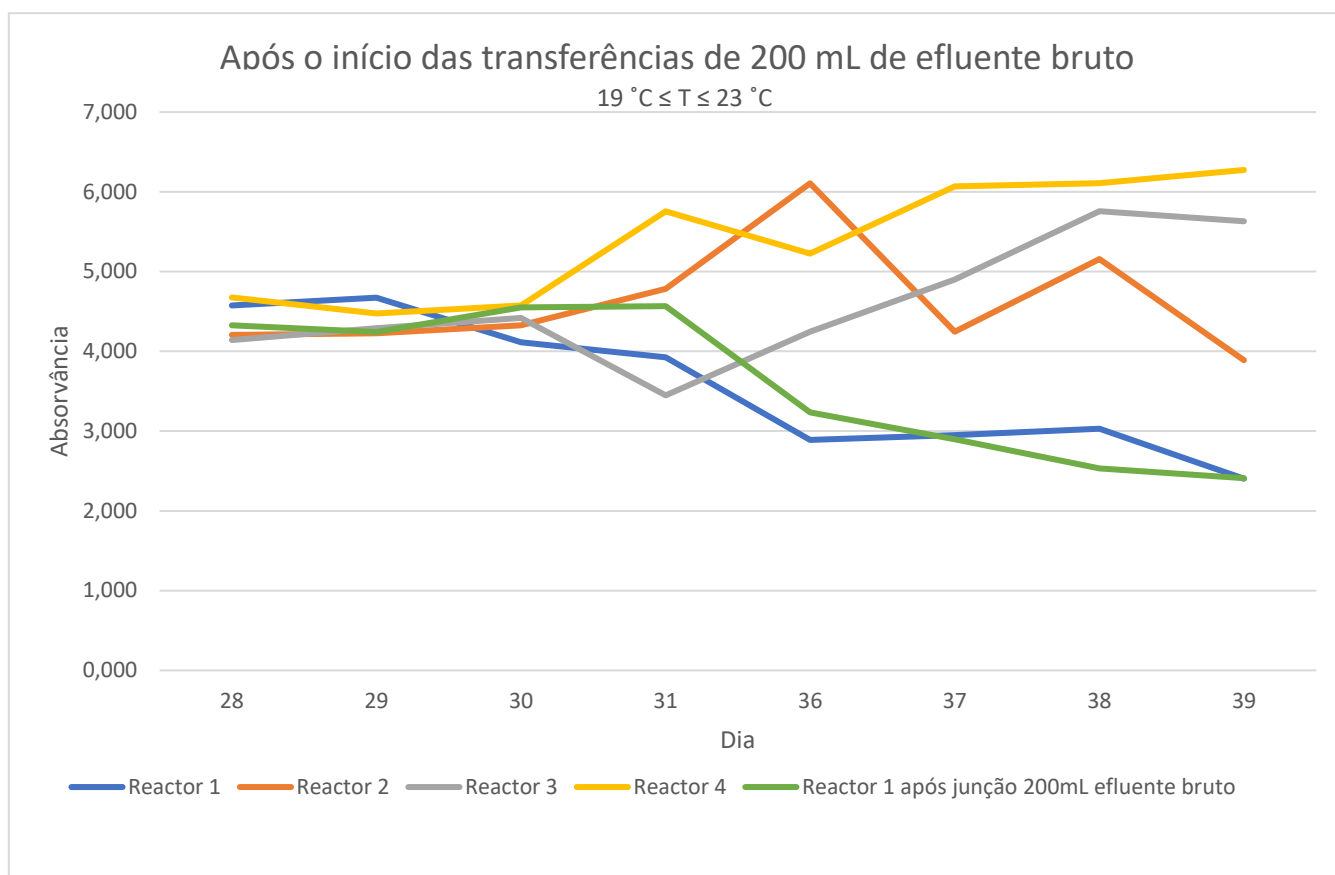


**Figura 22**-Curvas de crescimento dos 4 reatores até ao início das transferências

Durante o ensaio em regime descontínuo, através da análise das curvas de crescimento, é possível distinguir a fase lag (de latência ou de arranque), fase exponencial, fase estacionária.

As diferenças observadas nas curvas de crescimento dos Reatores 2 e 4 em relação ao Reatores 1 e 3, podem ser explicadas pelo fato dos Reatores 2 e 4 terem sido colocados atrás dos Reatores 1 e 3, o que poderá ter originado um efeito escudo em relação à luz artificial, não deixando passar tanta luz para os Reatores da frente.

De forma a preparar os reatores para os ensaios em regime semi-contínuo e de forma a que o ponto de partida de cada um deles fosse o mesmo, ao vigésimo quarto dia de inoculação, o efluente presente nos quatro reatores foi agrupado num só e redividido em quatro, o que levou ao equilíbrio entre as quatro curvas de crescimento.



**Figura 23**-Curvas de crescimento dos 4 reatores após o início das transferências

Em regime semi-contínuo, onde foram efetuadas as transferências de 200 mL de efluente entre reatores, as curvas de crescimento mantiveram-se constantes durante os primeiros dois dias de ensaio.

A curva de crescimento do “Reator 1” e do “Reator 1 após junção 200mL efluente bruto”, onde existia adição diária de 200 mL efluente, apresentam um decréscimo claro, o que sugere que a quantidade de efluente introduzido poderia estar a servir como uma diluição, pois todos os dias se retirava cultura desses reatores e adicionava-se efluente.

Pela análise da curva de crescimento do “Reator 2” verifica-se que existiu um crescimento da cultura de microalgas, o que prova que os nutrientes necessários para o seu crescimento se encontravam no meio, no entanto, após 9 dias de ensaio, poderá ter começado a existir uma diluição, pois todos os dias se retirava cultura deste reator e adicionava-se efluente + cultura, proveniente do Reator 1:1.



As curvas de crescimento do “Reator 3” e do “Reator 4” apresentam, maioritariamente um declive positivo, o que indica que os nutrientes, provenientes das transferências dos restantes reatores, se encontravam disponíveis nas condições ideais para o crescimento da cultura de microalgas.

Gek, Kee, e Teong (2016) estudaram o crescimento da microalga *Chlorella vulgaris*, utilizando um fertilizante orgânico em regime descontínuo e em regime semi-contínuo. Concluíram que as curvas de crescimento da *Chlorella vulgaris* em regime descontínuo apresenta uma maior linearidade quando comparadas com as curvas de crescimento em regime semi-contínuo (Gek, Kee, & Teong, 2016).

Este fato é facilmente perceptível, no presente estudo, analisando as curvas de crescimento em regime descontínuo e em regime semi-contínuo.

Durante este ensaio, além da medição da densidade ótica, mediu-se a temperatura ambiente do local onde estavam colocados os reatores. A temperatura medida variou entre os 19 °C e os 23 °C, encontrando-se dentro dos limites encontrados na literatura, sendo que geralmente, o valor ótimo deste parâmetro encontra-se entre 15 e 25 °C para a grande maioria de microalgas, incluindo a *Chlorella vulgaris*. Temperaturas muito elevadas ou muito reduzidas pode levar rapidamente ao declínio da taxa de crescimento (Larsdotter, 2006)

**Tabela 29--Produção da microalga *Chlorella vulgaris***

	<b>Nº dias de ensaio</b>	<b>Volume de efluente no reator (mL)</b>	<b>Produção microalgas em cada reator (g/L)</b>
<b>23 de Maio</b>	<b>36</b>	<b>1000</b>	<b>2,32</b>
<b>29 de Maio</b>	<b>42</b>	<b>1000</b>	<b>1,06</b>

A produção de microalgas no 36º dia de ensaio foi superior ao 42º dia de ensaio o que pode significar que à medida que a população de microalgas cresceu foi consumindo os nutrientes disponíveis reduzindo o seu nível o que por consequência se traduziu numa redução da densidade celular.

#### 4.2.3.2-Caraterização do efluente de Aviário antes, durante e após a bioremediação

A caraterização final do efluente, foi efetuada através do cálculo das respetivas taxas de remoção.

##### 4.3.3.2.4-Taxas de Remoção

As taxas de remoção foram calculadas em duas fases, primeiramente, em regime descontínuo entre o Efluente bruto e o último dia deste ensaio, seguido das taxas de remoção em regime semi-contínuo com transferências de 200mL entre reatores, entre o dia 18 e 23 de Maio, 23 e 24 de Maio, 24 e 25 de Maio e, por último, 25 e 26 de Maio. A Tabela 30 representa os resultados obtidos para as taxas de remoção.

**Tabela 30**-Taxas de remoção obtidas

	<b>Fósforo Total</b>	<b>CQO</b>
<b>Amostra</b>	<b>Taxa de remoção(%)</b>	<b>Taxa de remoção(%)</b>
Efluente bruto	84,5	89,3
15/mai filtrado		
18/mai filtrado	-	-
23/mai filtrado	38,1	-56,6
24/mai filtrado	-49,6	-14,3
25/mai filtrado	-41,5	25,0
26/mai filtrado	37,5	-50,0

Em regime descontínuo as taxas de remoção obtidas foram de 84,5% e 89,3% para o Fósforo Total e para o CQO, respetivamente. Em regime semi-contínuo foram obtidas taxas de remoção de 37,5-38,1 e de 25% para o Fósforo Total e CQO, respetivamente. A forte alternância das taxas de remoção em regime semi-contínuo, deve-se á adição diária de efluente bruto ao reator 1 e consequentemente ao reator 4.

Taxas de remoção negativas representam que parte da cultura de microalgas poderá ter morrido, o que leva á redissolução de nutrientes no meio.

M. Singh, Reynolds, e Das (2011) testaram o crescimento de diferentes culturas de microalgas (*Chlorella sorokiniana*, *Chlorella minutissima* e *Scenedesmus bífuga*) e respetivas remoções de nutrientes a partir de um digerido de cama de frango em regime descontínuo e em regime semi-contínuo. Em regime descontínuo foram atingidas taxas de remoção para o Fósforo Total de 70% (M. Singh, Reynolds, & Das, 2011)

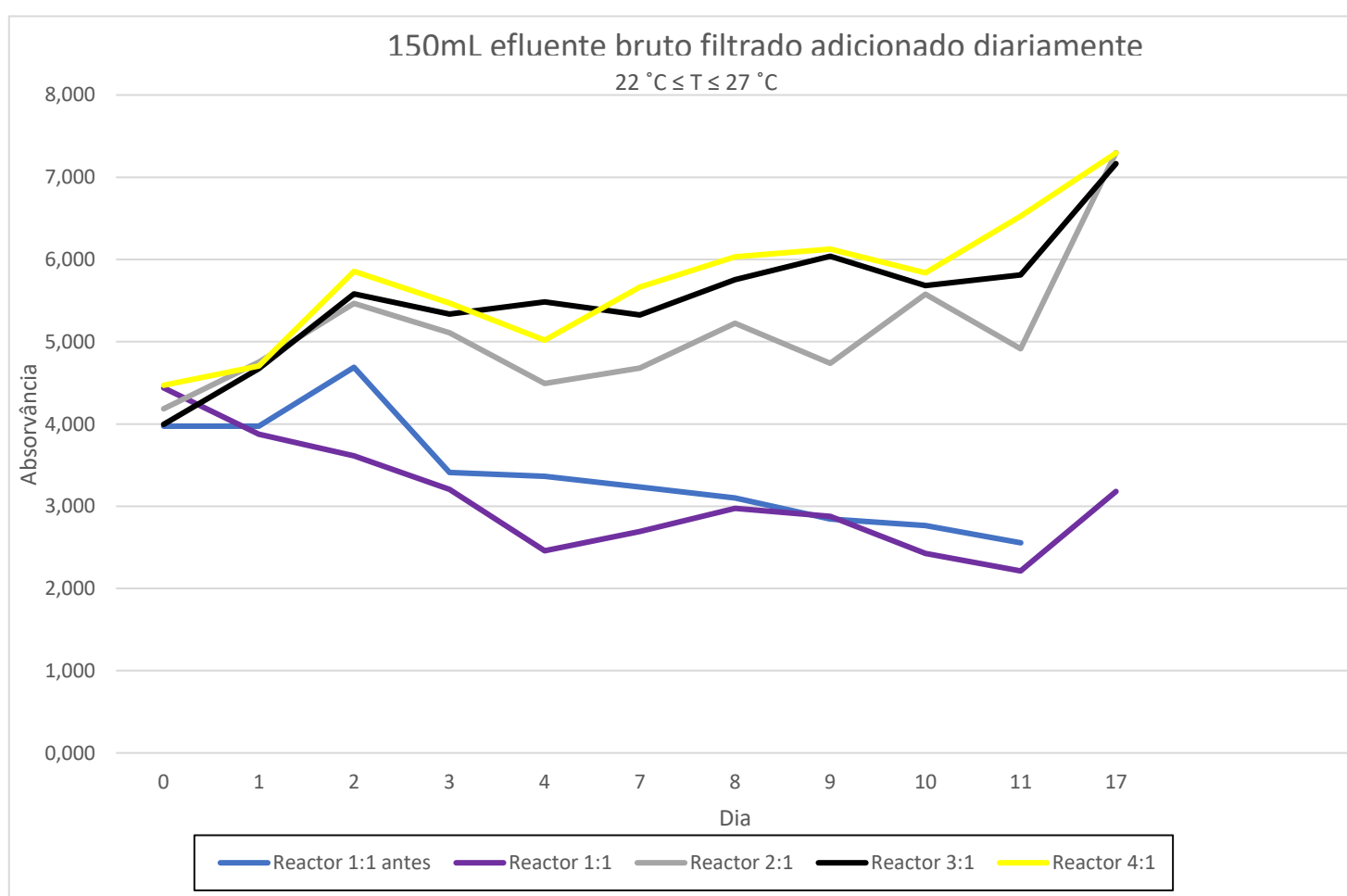
Hernández e colaboradores (2016) avaliaram o tratamento de águas residuais de matadouro através de um mix de culturas de microalgas (*Chlamydomonas subcaudata*, *Anabaena sp.* and *Nitzschia sp.*), obtendo taxas de remoção de 84,3-91,7%, 70-80,2% e de 56-90,7% para a CQO, azoto Kjeldahl e fósforo Total, respetivamente (Hernández et al., 2016).

### 4.3.3- Ensaio semicontínuo com transferência de 150 mL de efluente

#### 4.3.3.1- Crescimento de microalgas, pH, temperatura e produção de biomassa algal

Foram instalados oito reatores como descrito em 2.2.6.1, quatro correspondendo ao efluente bruto filtrado (não tratado) 1:1, 2:1, 3:1, 4:1 e quatro correspondendo ao efluente bruto filtrado tratado 1:2, 2:2, 3:2, 4.2.

O crescimento de microalgas foi controlado através da medição da densidade ótica ou absorvância, como descrito em 2.2.6.2



**Figura 24**-Curvas de crescimento dos reatores com efluente bruto filtrado

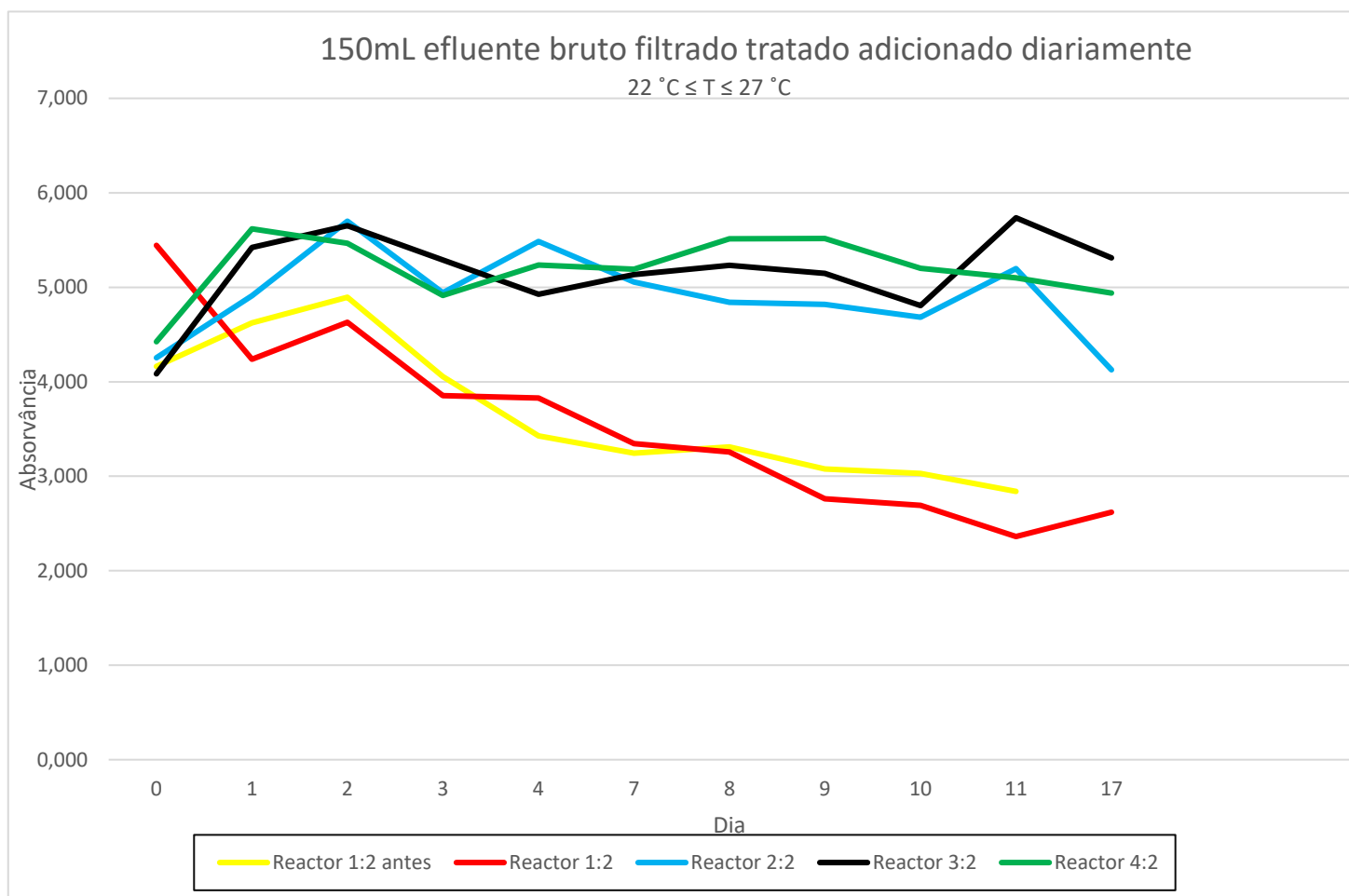
Em regime semi-contínuo, onde foram efetuadas as transferências de 150 mL de efluente bruto filtrado entre reatores, as curvas de crescimento mantiveram-se constantes durante o primeiro dia de ensaio.

A curva de crescimento do “Reator 1:1” e do “Reator 1:1 antes”, onde existia adição diária de 150 mL efluente bruto filtrado, apresentam um decréscimo claro, o que sugere que a quantidade de efluente introduzido poderia estar a servir como uma diluição, pois todos os dias se retirava cultura desses reatores e adicionava-se efluente.

A partir do dia 11 terminou o ensaio em regime semi-contínuo, no entanto a densidade ótica foi medida no dia 17, como forma de verificar se o crescimento da cultura de microalgas ainda se verificava.

Pela análise das curva de crescimento do “Reator 2:1”, Reator 3:1”e “Reator 4:1” verifica-se que a fase de crescimento exponencial foi a primeira fase, passando, depois, pela fase lag (de latência ou de arranque) e pela fase estacionária, o que indica que existiram os nutrientes necessários para que a cultura de microalgas conseguisse crescer de forma exponencial logo no início do ensaio.

O “Reator 3:1” e o “Reator 4:1” apresentam curvas de crescimento mais próximas das obtidas em regime descontínuo, possivelmente pois o efluente adicionado no “Reator 1:1” só será transferido para o “Reator 3:1” e “Reator 4:1” ao fim do 3º e 4º dia de ensaio, o que permite uma maior linearidade das curvas de crescimento destes reatores.



**Figura 25-**Curvas de crescimento dos reatores com efluente bruto filtrado

A curva de crescimento do “Reator 1:2” e do “Reator 1:2 antes”, onde existia adição diária de 150 mL efluente bruto filtrado, apresentam um decréscimo claro, o que sugere que a quantidade de efluente introduzido poderia estar a servir como uma diluição, pois todos os dias se retirava cultura desses reatores e se adicionava efluente.

A partir do dia 11 terminou o ensaio em regime semi-contínuo, no entanto a densidade ótica foi medida no dia 17, como forma de verificar se o crescimento da cultura de microalgas ainda se verificava.

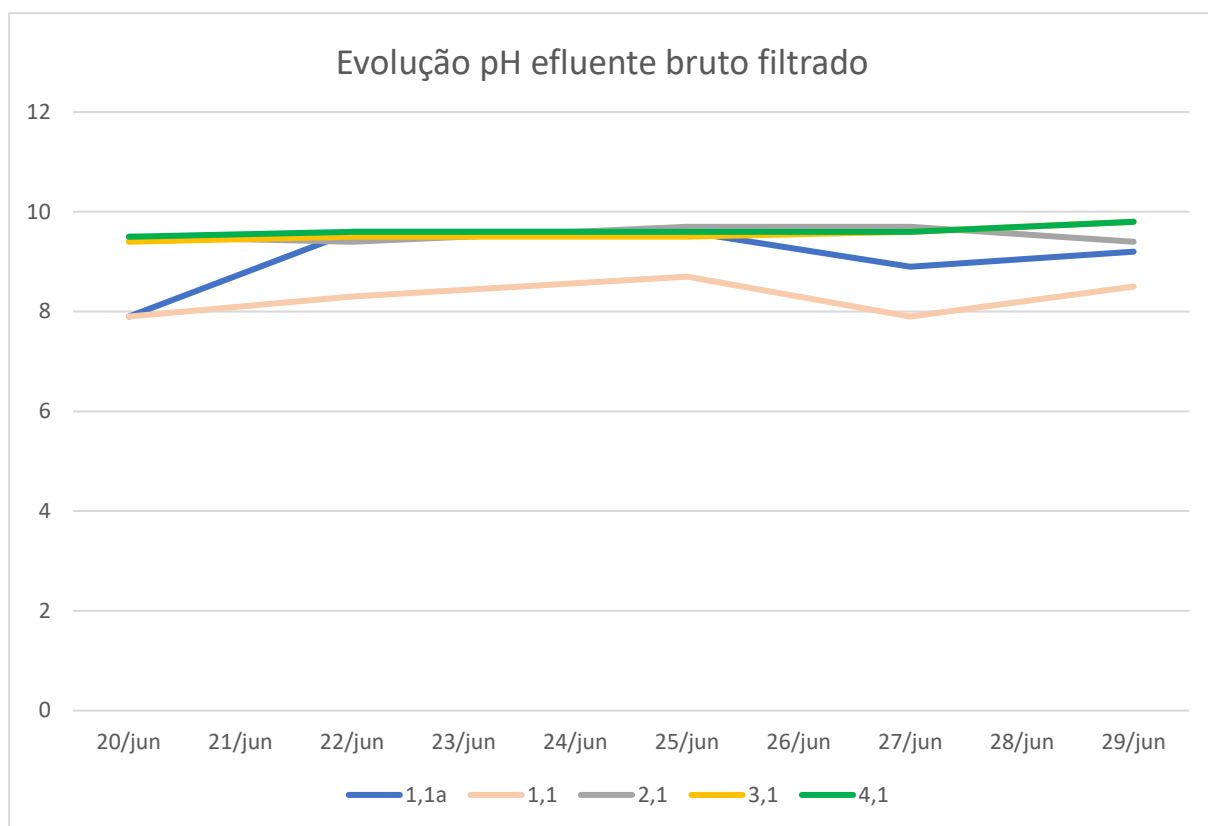
Pela análise das curva de crescimento do “Reator 2:2”, Reator 3:2”e “Reator 4:2” verifica-se que a fase de crescimento exponencial foi a primeira fase, passando, depois, pela fase lag (de latência ou de arranque) e pela fase estacionária, o que indica que existiram os nutrientes necessários para que a cultura de microalgas conseguisse crescer de forma exponencial logo no início do ensaio.

É possível verificar que a densidade ótica ou absorvância foi mais elevada com a adição de efluente bruto filtrado do que com efluente bruto filtrado tratado, tal fato, deve-se ao pré-tratamento efetuado no efluente bruto filtrado tratado que fez com que o Fósforo Total presente no mesmo diminuísse, assim a cultura de microalgas presente nos Reatores com efluente bruto filtrado tratado têm menos nutrientes á sua disposição.

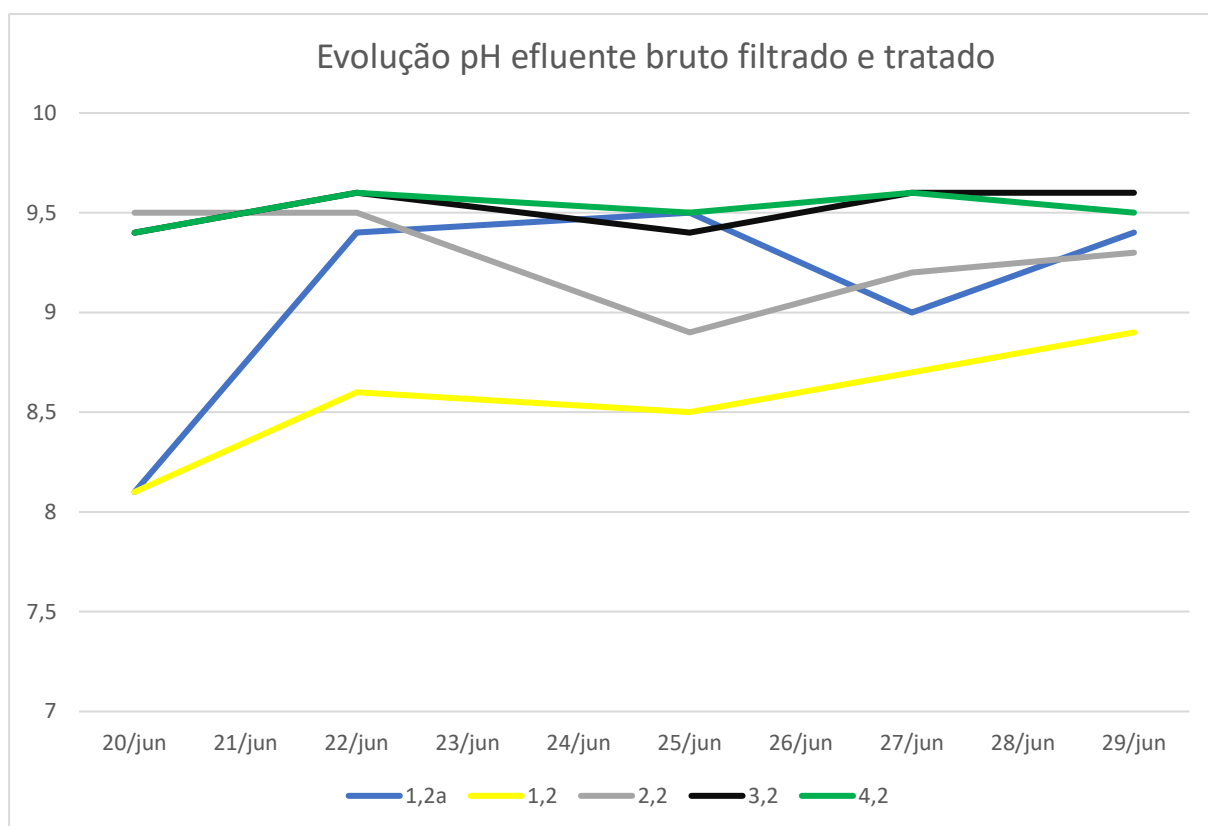
O “Reator 3:2” e o “Reator 4:2” apresentam curvas de crescimento mais próximas das obtidas em regime descontínuo, possivelmente pois o efluente adicionado no “Reator 1:2” só será transferido para o “Reator 3:2” e “Reator 4:2” ao fim do 3º e 4º dia de ensaio, o que permite uma maior linearidade das curvas de crescimento destes reatores.

Durante este ensaio, além da medição da densidade ótica, mediu-se também o pH e a temperatura ambiente do local onde estavam colocados os reatores. A temperatura medida variou entre os 22 °C e os 27 °C, não se encontrando dentro dos limites encontrados na literatura, no entanto não se afastou muito do valor ótimo, o que não terá afetado o crescimento das microalgas, sendo que geralmente, esse valor encontra-se entre 15 e 25 °C para a grande maioria de microalgas. Temperaturas muito elevadas ou muito reduzidas pode levar rapidamente ao declínio da taxa de crescimento (Larsdotter, 2006).

As figuras 33 e 34 representam a evolução do pH dos reatores com ao longo do ensaio.



**Figura 26-**Evolução pH dos reatores com efluente bruto filtrado



**Figura 27-**Evolução pH dos reatores com efluente bruto filtrado tratado



Como se pode observar pela análise das curvas de pH dos Reatores com efluente bruto filtrado e com efluente bruto filtrado tratado, a microalga *Chlorella vulgaris* foi adaptando o pH do meio em que se encontrava, às suas necessidades, variando o pH de todos reatores entre pH 8 e pH 10, sendo que para grande parte das espécies de microalgas, o pH deve manter-se entre 7 e 9 ((Barsanti et al, 2014).

De notar, que se atingiram valores de pH mais elevados nos reatores onde ocorreu maior crescimento da microalga, o que comprova o efeito alcalinizante do crescimento da microalga como resultado do consumo do CO<sub>2</sub> dissolvido no meio de cultura.

No que diz respeito á produção e produtividade de microalgas em cada um dos reatores, estes parâmetros foram calculados com base nos valores obtidos de peso seco, de cada dia, para cada um dos reatores. A Tabela 31 apresenta os valores obtidos para a produção e produtividade de microalgas em cada um dos reatores, bem como a duração total do ensaio e o volume de efluente presente em cada reator.

***Tabela 31--Produção da microalga C.Vulgaris***

	<b>Tipo</b>	<b>Nº dias de ensaio</b>	<b>Volume de efluente no reator (mL)</b>	<b>Produção microalgas em cada reator (g/L)</b>
<b>21 de Junho</b>	<b>Tratado</b>	<b>3</b>	<b>1000</b>	<b>1,86</b>
<b>21 de Junho</b>	<b>Não Tratado</b>	<b>3</b>	<b>1000</b>	<b>1,98</b>
<b>25 de Junho</b>	<b>Tratado</b>	<b>7</b>	<b>1000</b>	<b>1,83</b>
<b>25 de Junho</b>	<b>Não Tratado</b>	<b>7</b>	<b>1000</b>	<b>1,91</b>
<b>27 de Junho</b>	<b>Tratado</b>	<b>9</b>	<b>1000</b>	<b>2,07</b>
<b>27 de Junho</b>	<b>Não Tratado</b>	<b>9</b>	<b>1000</b>	<b>1,79</b>
<b>29 de Junho</b>	<b>Tratado</b>	<b>11</b>	<b>1000</b>	<b>1,72</b>
<b>29 de Junho</b>	<b>Não Tratado</b>	<b>11</b>	<b>1000</b>	<b>2,15</b>

A produção de microalgas foi mais elevada no efluente não tratado do que no efluente tratado exceto no 9º dia de ensaio no qual essa relação se inverteu. De uma forma geral, podemos dizer que a maior presença de azoto e fósforo no efluente não tratado foi o fator determinante da produção de microalga.

Os valores de produção situaram-se entre 1,72 e 2,15 g/L o que indica ter-se atingido um nível relativamente constante nos reatores nº4, para ambos os efluentes considerados.

#### 4.3.3.2-Caraterização do efluente de Aviário antes, durante e após a bioremediação

A caraterização final do efluente, foi efetuada através do cálculo das respetivas taxas de remoção.

##### 4.2.3.2.1-Taxas de Remoção

Em regime semi-contínuo com transferências de 150 mL de efluente entre reatores, as taxas de remoção para o efluente não tratado encontram-se nos 95,8% e 33,3% para o fósforo Total e para o azoto Kjeldahl, respetivamente. Já para o efluente tratado as taxas de remoção encontram-se nos 65,85%, 33,3% e 20% para o fósforo Total, azoto Kjeldahl e CQO, respetivamente.

M. Singh, Reynolds, e Das (2011) testaram o crescimento de diferentes culturas de microalgas (*Chlorella sorokiniana*, *Chlorella minutissima* e *Scenedesmus bífuga*) e respetivas remoções de nutrientes a partir de um digerido de cama de frango em regime descontínuo e em regime semi-contínuo. Em regime descontínuo foram atingidas taxas de remoção para o Fósforo Total de 70% (M. Singh, Reynolds, & Das, 2011)

Hernández e colaboradores (2016) avaliaram o tratamento de águas residuais de matadouro através de um mix de microalgas (*Chlamydomonas subcaudata*, *Anabaena sp.* and *Nitzschia sp.*), obtendo taxas de remoção de 84,3-91,7%, 70-80,2% e de 56-90,7% para o CQO, Azoto Kjeldahl e Fósforo Total, respetivamente (Hernández et al., 2016).

**Tabela 32**-Taxas de remoção obtidas no ensaio

	<b>Fósforo Total</b>	<b>Azoto Kjeldahl</b>	<b>CQO</b>
<b>Amostra</b>	<b>Taxa de remoção(%)</b>	<b>Taxa de remoção(%)</b>	<b>Taxa de remoção(%)</b>
22/jun não tratado	-	-	-
25/jun não tratado	95,79	0	0
29/jun não tratado	-55,56	33,3	0
22/jun tratado	-	-	-
25/jun tratado	65,85	14,29	20
29/jun tratado	-1,99	33,33	0

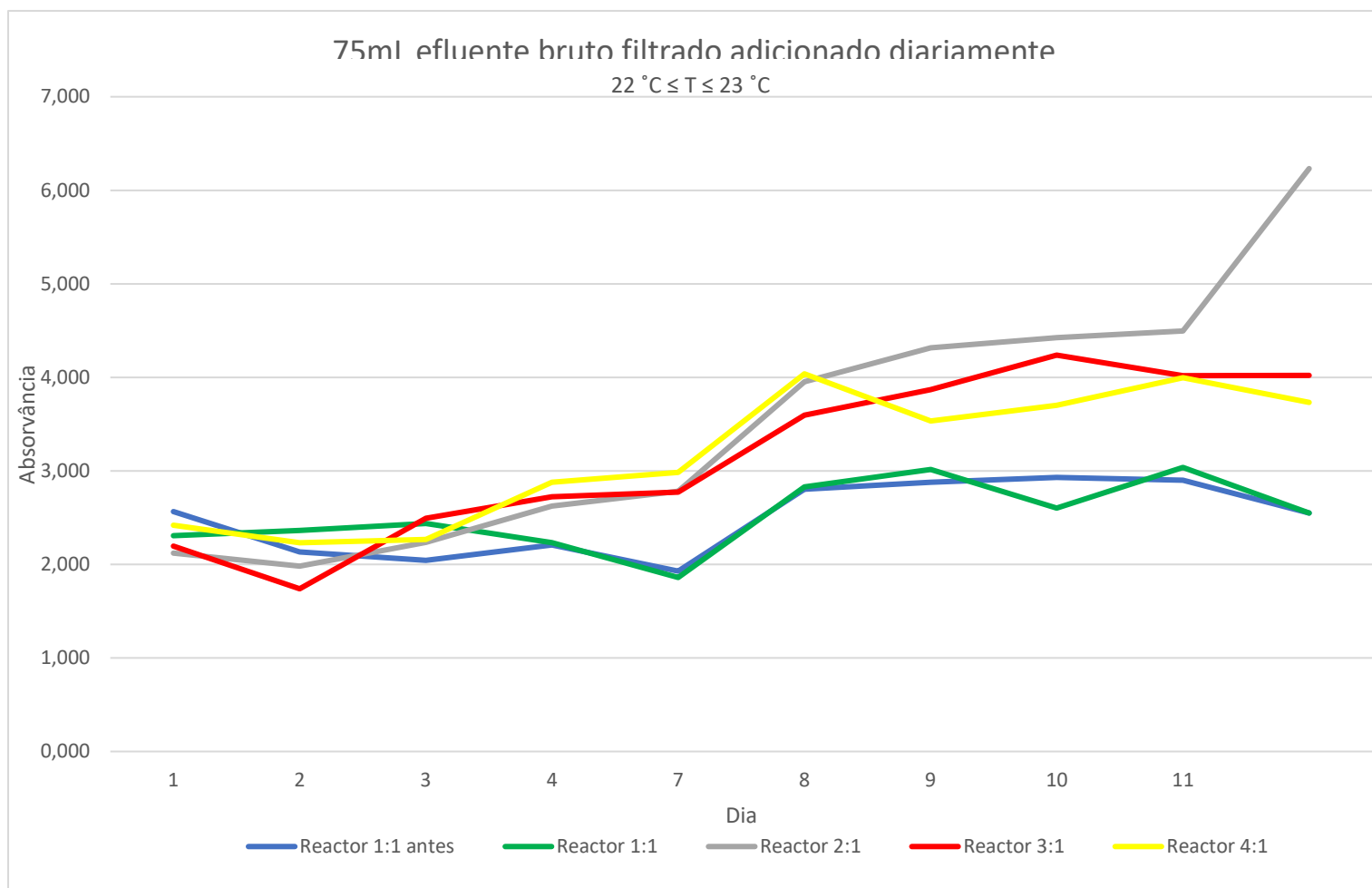
Taxas de remoção negativas representam que parte da cultura de microalgas poderá ter morrido, o que leva á redissolução de nutrientes no meio.

#### 4.3.4- Ensaio semicontínuo com transferência de 75 mL de efluente

##### 4.3.4.1- Crescimento de microalgas, temperatura e produção de biomassa algal

Foram instalados oito reatores como descrito em 2.2.6.1, quatro correspondendo ao efluente bruto filtrado (não tratado) 1:1, 2:1, 3:1, 4:1 e quatro correspondendo ao efluente bruto filtrado tratado 1:2, 2:2, 3:2, 4.2.

O crescimento de microalgas foi controlado através da medição da densidade ótica ou absorvância, como descrito em 2.2.6.2

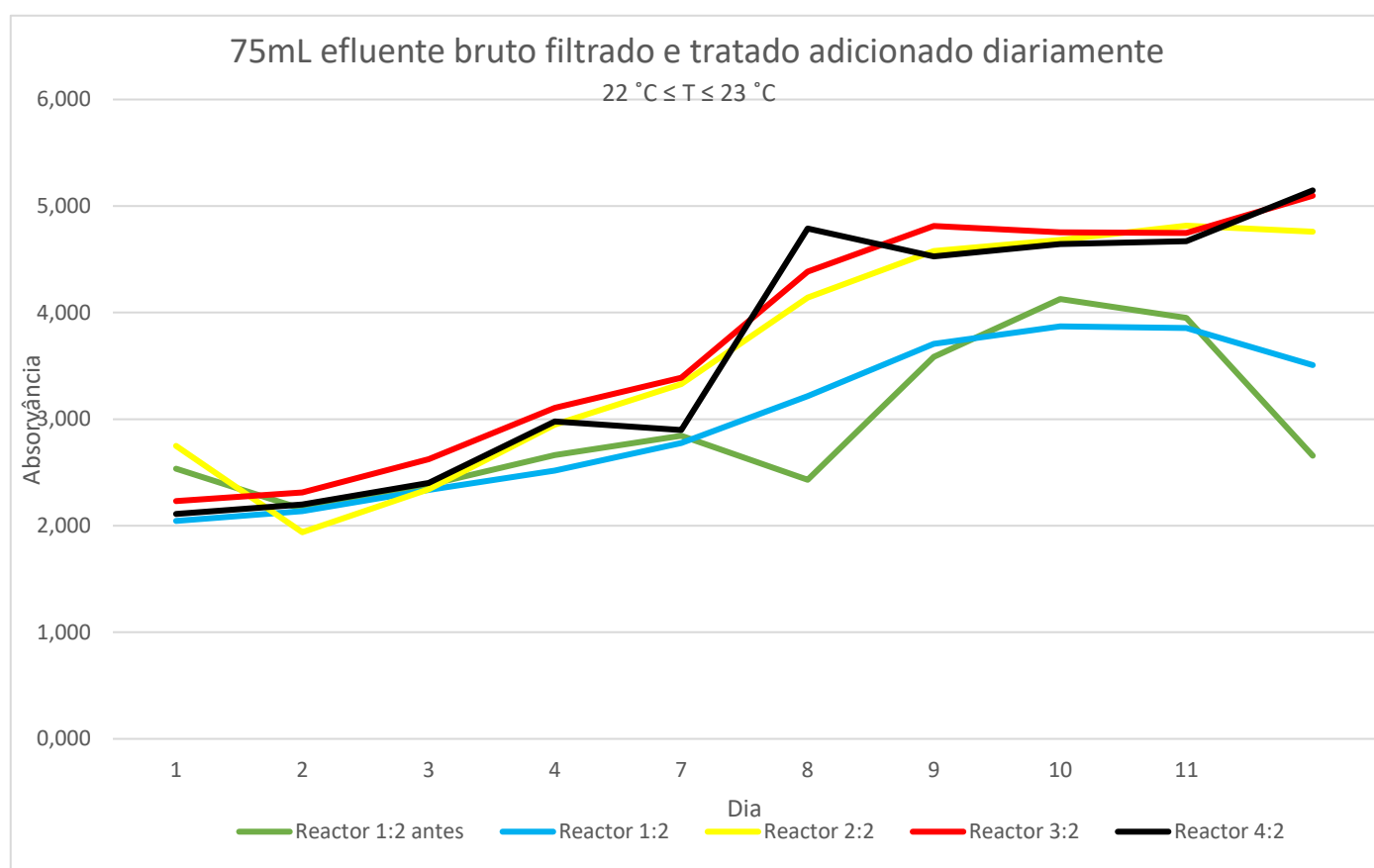


**Figura 28**-Curvas de Crescimento dos Reatores com efluente bruto filtrado

Através da análise das curvas de crescimento nota-se claramente, que o volume de efluente adicionado diariamente influencia o crescimento da cultura de microalgas. As curvas de todos os reatores apresentam claramente, fase lag (de latência ou de arranque), fase exponencial, fase estacionária, fase de declínio (ou de morte)(Nicolau et al, 2014).

O declive das curvas de crescimento do “Reator 1:1” e do “Reator 1:1 antes”, são inferiores aos restantes reatores, como resultado do efeito de diluição por adição de efluente e remoção de cultura. No entanto ao contrário dos ensaios anteriores nos quais se adicionaram maiores volumes de efluente ao reator 1, a densidade ótica mantém-se relativamente estacionária ao longo do tempo de ensaio e até aumenta ligeiramente a partir do 8º dia pois a diluição com 75 mL de efluente tem um efeito moderado na diminuição da DO e a razão de cultura removida do reator 1 para o 2 também é inferior à transferida nos ensaios anteriores.

Em contrapartida a quantidade de nutrientes transferida para os reatores 2, 3 e 4 é também menor do que nos ensaios anteriores o que se refletiu num menor crescimento da cultura, traduzido por densidades óticas inferiores a 5, enquanto nos ensaios anteriores foram geralmente entre 5 e 7.



**Figura 29**-Curvas de Crescimento dos Reatores com efluente bruto filtrado tratado

Através da análise das curvas de crescimento nota-se claramente, que o volume de efluente adicionado diariamente influencia o crescimento da cultura de microalgas. As curvas de todos os reatores apresentam claramente, fase lag (de latência ou de arranque), fase exponencial, fase estacionária, fase de declínio (ou de morte)(Nicolau et al, 2014).

O maior crescimento da cultura presente nos Reatores 3:2 e 4:2 não surpreende, pois todos os dias se adicionava cultura, contendo efluente não tratado, a esses dois reatores.

O declive das curvas de crescimento do “Reator 1:2” e do “Reator 1:2 antes”, é inferior aos restantes reatores, o que sugere que a quantidade de efluente introduzido não estaria a fornecer os nutrientes necessários para um maior crescimento da cultura.

Durante este ensaio, além da medição da densidade ótica, mediu-se a temperatura ambiente do local onde estavam colocados os reatores. A temperatura medida variou entre os 22 °C e os 23 °C, encontrando-se dentro dos limites encontrados na literatura (Larsdotter, 2006)

**Tabela 33-** Produção da microalga *Chlorella vulgaris*

	<b>Tipo</b>	<b>Nº dias de ensaio</b>	<b>Volume de efluente no reator (mL)</b>	<b>Produção microalgas em cada reator (g/L)</b>
<b>30 de Maio</b>	<b>Tratado</b>	<b>2</b>	<b>1000</b>	<b>0,71</b>
<b>30 de Maio</b>	<b>Não Tratado</b>	<b>2</b>	<b>1000</b>	<b>0,57</b>
<b>1 de Junho</b>	<b>Tratado</b>	<b>4</b>	<b>1000</b>	<b>1,34</b>
<b>1 de Junho</b>	<b>Não Tratado</b>	<b>4</b>	<b>1000</b>	<b>1,16</b>
<b>4 de Junho</b>	<b>Tratado</b>	<b>7</b>	<b>1000</b>	<b>1,5</b>
<b>4 de Junho</b>	<b>Não Tratado</b>	<b>7</b>	<b>1000</b>	<b>1,21</b>
<b>6 de Junho</b>	<b>Tratado</b>	<b>9</b>	<b>1000</b>	<b>1,45</b>
<b>6 de Junho</b>	<b>Não Tratado</b>	<b>9</b>	<b>1000</b>	<b>1,31</b>
<b>8 de Junho</b>	<b>Tratado</b>	<b>11</b>	<b>1000</b>	<b>1,67</b>
<b>8 de Junho</b>	<b>Não Tratado</b>	<b>11</b>	<b>1000</b>	<b>1,22</b>

A produção de microalgas neste ensaio foi inferior à dos anteriores ensaios com transferência de uma maior quantidade de efluente, confirmando a tendência já observada nas curvas de densidade ótica.

Neste caso a produção do efluente tratado foi superior à do efluente não tratado, talvez porque numa situação de maior escassez dos nutrientes principais (azoto e fósforo) o contributo de outros nutrientes presentes no efluente tratado e que determinam a sua CQO mais elevada, foi o fator preponderante para o crescimento da microalga.

#### 4.3.4.2-Caso Real

No fim dos ensaios foi efetuada uma conversão simples de modo a obter a produção de biomassa algal que se iria obter em condições reais. A Tabela 34 representa os valores que se poderiam obter, ao realizar este conjunto de ensaios a uma escala real.

***Tabela 34**-Possível produção de biomassa algal em escala real*

<b>Volume transferido</b>	<b>Produção</b>	<b>Volume transferido</b>	<b>Produção</b>	<b>Produção</b>
<b>mL</b>	<b>g/L</b>	<b>m<sup>3</sup></b>	<b>kg/m<sup>3</sup></b>	<b>kg/Volume transferido</b>
200	1,06	2000	1,06	2120
150	2,15	1500	2,15	3225
75	1,22	750	1,22	915

Repetindo os ensaios efetuados, a uma escala real, seria possível obter produções de biomassa alga de 1,06 kg/m<sup>3</sup> a 2,15 kg/m<sup>3</sup> ou seja, desde 2120 kg de biomassa/2000 m<sup>3</sup> de volume transferido a 3225 kg de biomassa/1500 m<sup>3</sup> de volume transferido.

#### 4.3.4.2-Caraterização do efluente de Aviário antes, durante e após a biorremediação

A caraterização final do efluente, foi efetuada através do cálculo das respetivas taxas de remoção.

##### 4.3.4.2.1-Taxas de Remoção

*Tabela 35-Taxas de Remoção*

	<b>Fósforo Total</b>	<b>Azoto Kjeldahl</b>	<b>CQO</b>
<b>Amostra</b>	<b>Taxa de remoção(%)</b>	<b>Taxa de remoção(%)</b>	<b>Taxa de remoção(%)</b>
1/jun não tratado	-	16,7	25
4/jun não tratado			
8/jun não tratado	-	-	67
1/jun tratado	-	0	0
4/jun tratado	-	0	0
8/jun tratado	-	0	0

Em regime semi-contínuo com transferências de 75 mL de efluente entre reatores, as taxas de remoção para o efluente não tratado encontram-se nos 16,7% e 25-67% para o Azoto Kjeldahl e para o CQO, respetivamente. Já para o efluente tratado não se registaram taxas de remoção.

Taxas de remoção negativas representam que parte da cultura de microalgas poderá ter morrido, o que leva á redissolução de nutrientes no meio.

M. Singh, Reynolds, e Das (2011) testaram o crescimento de diferentes culturas de microalgas (*Chlorella Sorokiniana*, *Chlorella Minutissima* e *Scenedesmus Bíjuga*) e respetivas remoções de nutrientes a partir de um digerido de cama de frango em regime descontínuo e em regime semi-contínuo. Em regime descontínuo foram atingidas taxas de remoção para o Fósforo Total de 70% (M. Singh, Reynolds, & Das, 2011)

Hernández e colaboradores (2016) avaliaram o tratamento de águas residuais de matadouro através de um mix de microalgas (*Chlamydomonas subcaudata*, *Anabaena sp.* and *Nitzschia sp.*),



obtendo taxas de remoção de 84,3-91,7%, 70-80,2% e de 56-90,7% para o CQO, Azoto Kjeldahl e Fósforo Total, respetivamente (Hernández et al., 2016).

#### 4.3.5-Valores finais obtidos Vs Valores limite de descarga águas residuais em meio hídrico natural

Na Tabela 36, encontram-se apresentados os Valores limite de descarga de águas residuais em meio hídrico natural e o Valores finais obtidos após a bioremediação do efluente de aviário, respetivamente.

**Tabela 36-** Valores limite de descarga águas residuais em meio hídrico natural (Anexo XVII, D.Lei 236/98 de 1 de Agosto) e Valores Finais após a bioremediação

	Rede de águas residuais domésticas	Rede de águas residuais pluviais
Parâmetros a avaliar	VLE (Anexo XVIII - Descarga de águas residuais em meio hídrico natural) D.Lei 236/98 de 1 de agosto	
pH (Escala de Sørensen)	entre 6 e 9	
Carência bioquímica de Oxigénio "CBO5" (mg/L O2)	40	
Carência Química de Oxigénio "CQO" (mg/L O2)	150	
Sólidos Suspensos Totais "SST" (mg/L)	60	
Azoto amoniacal (mg/L NH4)	10	
Nitritos (mg/L NO2)	-	
Nitratos (mg/L NO3)	50	
Azoto total (mg/L N)	15	
Fósforo total (mg/L P)	10	

	pH	Fósforo	CQO	Azoto
Amostra	(Escala de Sørensen)	mg/L	mgO2/L	mg/L
Reator 4:1	9,8	0,75	272	3,14
Reator 4:2	9,5	13,91	272	6,29

Apesar de os resultados obtidos serem satisfatórios, nenhum dos efluentes contidos nos Reatores 4:1 e 4:2 poderiam ser descarregados em sistemas hídricos naturais, devido aos valores ainda acima dos limites para o CQO, pH, para ambos os reatores e Fósforo para o Reator 4:2.

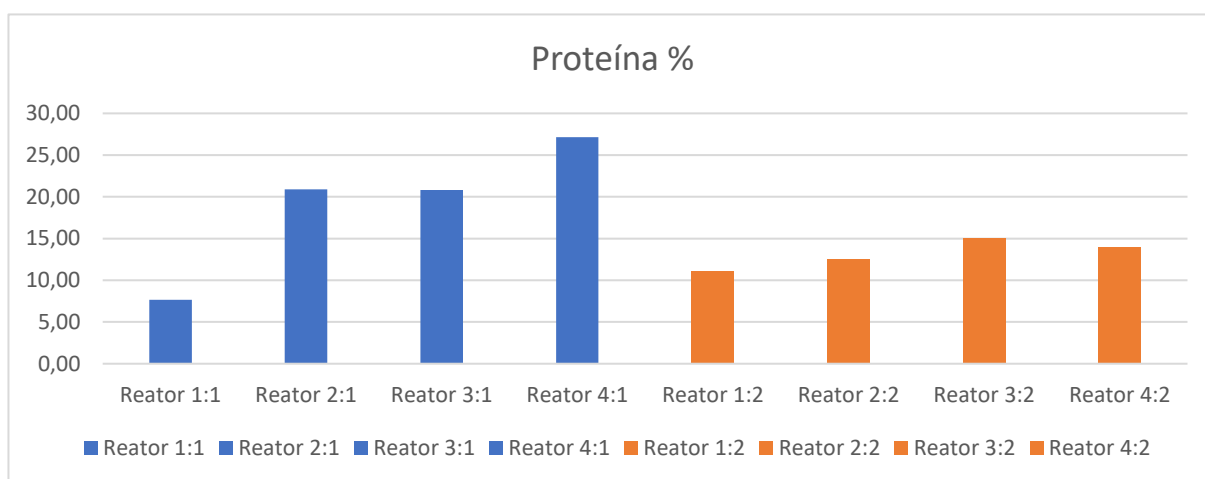
Um processo adicional de remediação como a digestão anaeróbia poderia ser utilizado numa fase final para permitir atingir os limites adequados à descarga em coletores.

#### 4.3.6- Caraterização final da biomassa algal obtida

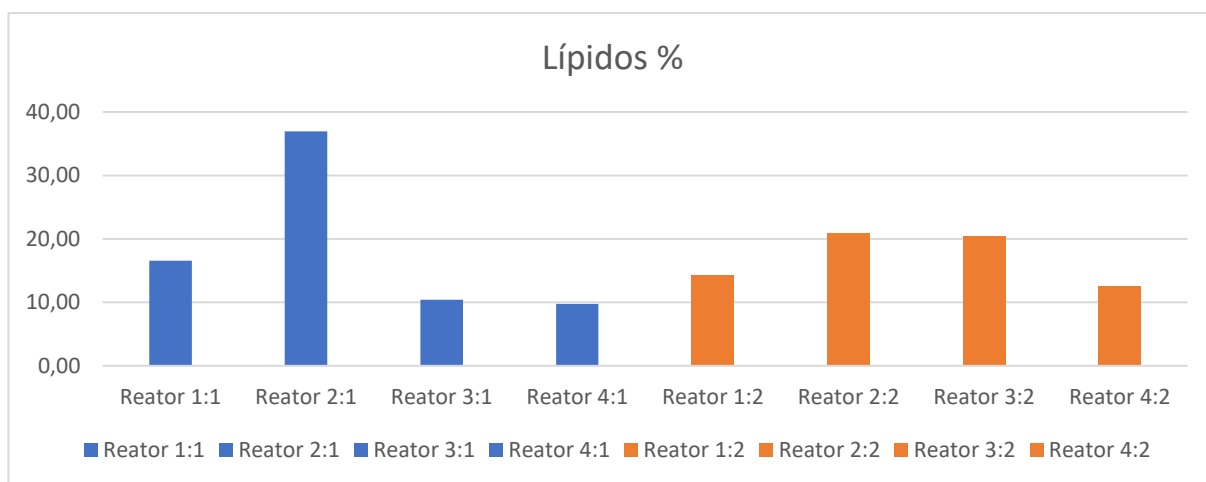
##### 4.3.6.1-Proteína, Lípidos, açucares totais e cinzas

A caraterização final da biomassa foi obtida como referido em 4.2.7.

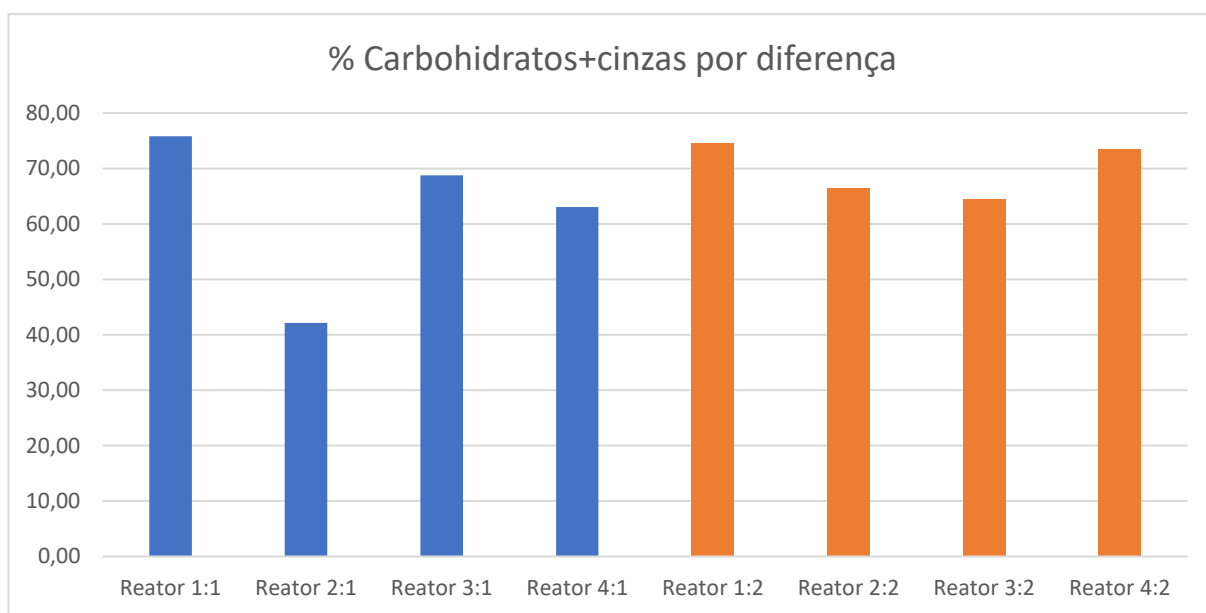
As figuras 38, 39 e 40 representam os resultados obtidos para a Proteína, Lípidos e Carbohidratos + cinzas, respetivamente, em percentagens de peso seco.



**Figura 30- Teor de Proteína final obtida**



**Figura 31-**Teor de Lípidos finais obtidos



**Figura 32-**Teor de Carbohidratos+Cinzas obtidos

Pela análise dos resultados obtidos verifica-se que a existe um maior teor de proteínas na biomassa algal presente nos Reatores 1:1; 2:1; 3:1 e 4:1, efluente filtrado, em comparação com os Reatores 1:2; 2:2; 3:2 e 4:2, efluente filtrado e tratado com cinzas de biomassa, tal fato pode verificar-se pois o efluente filtrado, ao ser tratado com cinzas, pode fazer com que algumas partículas presentes no efluente precipitem. Sendo que o Fósforo é um nutriente essencial para o crescimento de

microalgas e através do tratamento do efluente, este parâmetro foi diminuído drasticamente, tal discrepância entre a biomassa algal dos Reatores com efluente filtrado e filtrado e tratado, em termos de teor de proteína, pode significar as microalgas presentes nos reatores com efluente tratado estariam em stress. O teor de lípidos entre todos os reatores não sofreu grandes alterações, tirando o Reator 2:1 com um teor de lípidos de cerca de 37%, o que pode indicar que as microalgas neste reator se encontravam em stress. O teor lipídico tende a aumentar quando as microalgas se encontram em stress. Em relação aos carboidratos + cinzas, este parâmetro foi comum a todos os reatores, no entanto, apesar de representar a soma entre os carboidratos e as cinzas, este apresenta valores superiores aos encontrados na literatura para o teor de carboidratos. Foram obtidos valores máximos, de proteína para o Reator 4:1, 27%, lípidos para o Reator 2:1, 37% e de Carboidratos + cinzas para os Reatores 1:1 e 1:2 com 75,79% e 74,65%, respetivamente.

Markou, Iconomou, e Muylaert (2016), estudaram o crescimento da microalga *Chlorella vulgaris* em lixiviado de cama de frango, obtendo 35-38,5%, 24,2-27,2% e 19-25,8% de teor proteína, lípidos e carboidratos, respetivamente (Markou, Iconomou, & Muylaert, 2016)

## 4.4-Conclusões

Neste ensaio foi estudado a Bioremediação de efluente de aviário em regime descontínuo e semi-contínuo. Apesar dos resultados obtidos serem satisfatórios, a descarga destes efluentes bioremediados em meios hídricos naturais não poderia ser efetuada, o CQO, o fósforo Total e o pH, ainda se encontravam acima dos limites. No entanto este efluente tratado poderia ser utilizado como fertilizante, sistema de rega, ou até mesmo ser incorporado no sistema de limpeza do próprio Aviário. A biomassa algal obtida poderia servir como um suplemento á ração oferecida ás aves, contendo teores de proteínas e lípidos bastante aceitáveis.

## 5-Referências Bibliográficas

- Almomani, F. A., & Örmeci, B. (2016). Performance Of *Chlorella Vulgaris* , *Neochloris Oleoabundans* , and mixed indigenous microalgae for treatment of primary effluent , secondary effluent and centrate. *Ecological Engineering*, 95, 280–289. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2016.06.038>
- Alves, Joel. 2015. “Valorização de Resíduos Por Co-Digestão Aneróbia.” *Dissertação de Mestrado em Sistemas de Energias Renováveis - Instituto Politécnico de Viana do Castelo*.
- APA. 2012. “Análise Técnica Das Opções de Transição Para Uma Economia de Baixo Carbono Competitiva Em 2050.” *Roteiro Nacional de Baixo Carbono 2050* : 122pp.
- . 2014. “Persu 2020, Avaliação Ambiental. Resumo Não Técnico.” : 125pp.
- . 2017. “Inventário Nacional de Emissões Atmosféricas (NIR 2017 – Emissões 2015).” *Departamento de Alterações Climáticas (DCLIMA)*: 1–6pp.
- . 2018. “Inventário Nacional de Emissões Atmosféricas (Estimativas preliminares-emissões de 2016)” Nacional, I., & Atmosféricas, D. E. (2018). Departamento de Alterações Climáticas ( DCLIMA ), 1–6.
- APHA. (1985), *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 16th ed., American Public Health Association, Washington D.C.
- Asmare, A. M., Demessie, B. A., & Murthy, G. S. (2014). Investigation of microalgae co-cultures for nutrient recovery and algal biomass production from dairy manure. *Applied Engineering in Agriculture*, 30(2), 335–342. <https://doi.org/10.13031/aea.30.10151>

- Barcellos, A. D., Barreto, A. G. da S. S., Machado, B. A. S., & Druzian, J. I. (2012). Microalgas E Seu Potencial De Uso. *Cadernos de Prospecção*, 5(4), 178–184. <https://doi.org/10.9771/S.CPROSP.2012.005.019>
- Bourgeois, Vincent. 2017. “Early Estimates of CO2 Emissions from Energy Use.” *Eurostat Press Office* 79/2007(4 May). <http://ec.europa.eu/eurostat/documents/2995521/8010076/8-04052017-BP-EN.pdf/7b7462ca-7c53-44a5-bafb-23cc68580c03>.
- Bustillo-Lecompte, C., Mehrvar, M., & Quiñones-Bolaños, E. (2016). Slaughterhouse Wastewater Characterization and Treatment: An Economic and Public Health Necessity of the Meat Processing Industry in Ontario, Canada. *Journal of Geoscience and Environment Protection*, 04(04), 175–186. <https://doi.org/10.4236/gep.2016.44021>
- Câmara Municipal Lisboa. 2015. “Plano Municipal de Gestão de Resíduos Do Município de Lisboa.”
- Carvalho, I. S. (2013). Microalgae taxonomy and breeding, (June). Retrieved from <https://www.researchgate.net/publication/286617872>
- Carvalho, Lopo José Infante da Câmara Lopo. 2010. “Avaliação Do Potencial De Produção De Biogás a Partir De Biomassa Proveniente De Culturas Dedicadas E De Lamas De Etari.” *Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Sistemas Bioenergéticos - Instituto superior de Agronomia de Lisboa*.
- Cheng, H. and Tian, G. (2013), “Preliminary Evaluation of A Newly Isolated Microalga Scenedesmus sp. CHX1 for Treating Landfill Leachate”, Third International Conference on Intelligent System Design and Engineering Applications, pp. 1057–1060.
- Daliry, S., Hallajisani, A., Roshandeh, J. M., Nouri, H., & Golzary, A. (2017). Investigation of optimal condition for Chlorella vulgaris microalgae growth. *Global J. Environ. Sci. Manage*, 3(2), 217–230. <https://doi.org/10.22034/gjesm.2017.03.02.01>
- da Silva, RICARDO PIRES MOREIRA.2005. Seminário apresentado na disciplina BIOQUÍMICA DO TECIDO ANIMAL, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul
- Decreto-Lei nº 73/2011 de 17 de Junho. 2011. “Decreto-Lei Nº 73/2011.” *Diário da República* 1ª Série(Nº116): 1–50pp.

Decreto-Lei n.º 178/2006 de 5 de Setembro de 2006. “Decreto-Lei n.º 178/2006 .” *Diário da República* 1ª Série(Nº171)

Direção-Geral de Atividades Económicas - <http://www.dgae.gov.pt/servicos/sustentabilidade-empresarial/economia-circular.aspx>

DGEG. 2017b. República Portuguesa - Economia *Estatísticas Rápidas - Renováveis*.

———. 2018. República Portuguesa- estatísticas rápidas-nº165-julho de 2018

Despacho n.º 12571/2014. 2014. “Ministério Do Ambiente, Ordenamento Do Território E de Energia - Gabinete Do Secretário de Estado Do Ambiente.” In *Diário Da República*, , 26081pp.

Despacho nº 1230/2018.2018. “Ambiente e Agricultura, Florestas e Desenvolvimento Rural - Gabinetes dos Secretários de Estado do Ambiente e das Florestas e do Desenvolvimento Rural.” In *Diário Da República*.

EA. 2016. “World Energy Outlook 2016 (Executive Summary).” *World Energy Outlook*: 1–8. [http://www.iea.org/publications/freepublications/publication/WEB\\_WorldEnergyOutlook2015ExecutiveSummaryEnglishFinal.pdf](http://www.iea.org/publications/freepublications/publication/WEB_WorldEnergyOutlook2015ExecutiveSummaryEnglishFinal.pdf)

Ganesan V, S. H. (2014). Biomass from Microalgae: An Overview. *Oceanography: Open Access*, 02(01), 1–7. <https://doi.org/10.4172/2332-2632.1000118>

Gek, C., Kee, M., & Teong, K. (2016). Pilot-scale semi-continuous cultivation of microalgae *Chlorella vulgaris* in bubble column photobioreactor ( BC-PBR ): Hydrodynamics and gas – liquid mass transfer study. *ALGAL*, 15, 65–76. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.02.001>

Global Methane Initiative. 2016. “Global Methane Initiative Overview of Anaerobic Digestion for Municipal Solid Waste.” (October).

Hachmann, T. L., Laureth, J. C. U., Parizotto, A. A., & Júnior, A. C. G. (2013). Resíduos de aves e suínos : Potencialidades Poultry and swine waste : potential. *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*, 59–65.



- Hena, S., Fatimah, S., & Tabassum, S. (2015). Cultivation of algae consortium in a dairy farm wastewater for biodiesel production. *Water Resources and Industry*, 10, 1–14.  
<https://doi.org/10.1016/j.wri.2015.02.002>
- Hernández, D., Riaño, B., Coca, M., Solana, M., Bertucco, A., & García-gonzález, M. C. (2016). Microalgae cultivation in high rate algal ponds using slaughterhouse wastewater for biofuel applications, 285, 449–458. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2015.09.072>
- Hu, Y., Cheng, H., & Tao, S. (2017). Environmental and human health challenges of industrial livestock and poultry farming in China and their mitigation. *Environment International*, 107(March), 111–130.  
<https://doi.org/10.1016/j.envint.2017.07.003>
- Instituto Nacional de Estatística. 2016. *Estatísticas Do Ambiente 2015*. ed. Instituto Nacional de Estatística I. P.
- Instituto Nacional de Estatísticas. (2018). *Estatísticas Agrícolas - 2017*. <https://doi.org/0079-4139>
- Ji, M.-K., Abou-Shanab, R. A. I., Hwang, J.-H., Timmes, T. C., Kim, H.-C., Oh, Y.-K., & Jeon, B.-H. (2013). Removal of Nitrogen and Phosphorus from Piggery Wastewater Effluent Using the Green Microalga *Scenedesmus obliquus*. *Journal of Environmental Engineering*, 139(9), 1198–1205.  
[https://doi.org/10.1061/\(ASCE\)EE.1943-7870.0000726](https://doi.org/10.1061/(ASCE)EE.1943-7870.0000726)
- Jorge, V. (2017). Potencial de produção de bioetanol a partir da microalga *S. obliquus* utilizada na bioremediação de lixiviado de aterro.
- Kshirsagar, D.A. (2013), “Bioremediation of Wastewater By Using Microalgae : an Experimental Study”, *International Journal of Life Science Biotechnology and Pharma Research*, Vol. 2 No. 3, July 2013
- Larsdotter, K. (2006). Wastewater treatment with microalgae – a literature review. *Vatten*, 62, 31–38.
- Lu, W., Wang, Z., Wang, X., & Yuan, Z. (2015). Cultivation of *Chlorella* sp. using raw dairy wastewater for nutrient removal and biodiesel production: Characteristics comparison of indoor bench-scale and outdoor pilot-scale cultures. *Bioresource Technology*, 192, 382–388.  
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.05.094>
- Manitoba-Agriculture-Food-and-Rural-Development. (2015). Properties of Manure, (November), 42.  
 Retrieved from <https://www.gov.mb.ca/agriculture/environment/nutrient-management/pubs/properties-of-manure.pdf>
- Markou, G., Iconomou, D., & Muylaert, K. (2016). Applying raw poultry litter leachate for the cultivation of

Arthrospira platensis and Chlorella vulgaris. *Algal Research*, 13, 79–84.

<https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.11.018>

Mata, T. M., Martins, A. A., & Caetano, N. S. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(1), 217–232.

<https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.07.020>

MATOS J., S. A. R. G. A. F. A. S. L. J. (2011). *GUIÃO DE BOAS PRÁTICAS - Minimização dos Impactos Ambientais na Indústria Têxtil e Regulamentação REACH*.

Mohamed, O. A., Masood, S. H., & Bhowmik, J. L. (2017). Characterization and dynamic mechanical analysis of PC-ABS material processed by fused deposition modelling: An investigation through I-optimal response surface methodology. *Measurement: Journal of the International Measurement Confederation*, 107, 128–141. <https://doi.org/10.1016/j.measurement.2017.05.019>

Nunes, B. (2017). Evolução e Situação atual dos RSU em Portugal: Estudo de caso: comparação dos sistemas de RSU em Sintra e Münster.

Orrico Júnior, Marco A. P., Orrico, Ana C. A., & Lucas Júnior, Jorge de. (2011). “Produção animal e o meio ambiente: uma comparação entre potencial de emissão de metano dos dejetos e a quantidade de alimento produzido”. *Engenharia Agrícola*, 31(2), 399-410.

Pereira, J. (2018). Otimização da extração de óleo essencial de *Eucalyptus globulus* e caracterização dos extratos obtidos.

Pittman, J. K., Dean, A. P., & Osundeko, O. (2011). The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources. *Bioresource Technology*, 102(1), 17–25.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.035>

Priyadarshani I, Sahu D, R. B. (2011). Microalgal bioremediation : Current practices and perspectives. *J Biochem Tech*, 3(3), 299–304. <https://doi.org/-> <http://dx.doi.org/10.1093/ntr/nts189>

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. *Biologia Vegetal*. 8ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 906, 2007.

Richards, R. G., & Mullins, B. J. (2013). Using microalgae for combined lipid production and heavy metal

removal from leachate. *Ecological Modelling*, 249, 59–67.

<https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2012.07.004>

Russo, M (2003). Tratamento de Resíduos Sólidos. Coimbra, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra

Sandoval R., M. A., Flores E., M. F., Narváez C., R. A., & López-Villada, J. (2015). Phototrophic culture of *Chlorella* sp. using charcoal ash as an inorganic nutrient source. *Algal Research*, 11, 368–374.

<https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.07.008>

Singh, A. L., Jamal, S., Baba, S. A., & Islam, M. (2014). Environmental and Health Impacts from Slaughter Houses Located on the City Outskirts : A Case Study. *Journal of Environmental Protection*, 5(May), 566–575. <https://doi.org/10.4236/jep.2014.56058>

Singh, M., Reynolds, D. L., & Das, K. C. (2011). Microalgal system for treatment of effluent from poultry litter anaerobic digestion. *Bioresource Technology*, 102(23), 10841–10848.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.09.037>

Singh, R., Birru, R., & Sibi, G. (2017). Nutrient Removal Efficiencies of *Chlorella vulgaris* from Urban Wastewater for Reduced Eutrophication. *Journal of Environmental Protection*, 08(01), 1–11. <https://doi.org/10.4236/jep.2017.81001>

Slade, E. M., Riutta, T., Roslin, T., & Tuomisto, H. L. (2016). The role of dung beetles in reducing greenhouse gas emissions from cattle farming. *Scientific Reports*, 6(May 2015), 1–9.

<https://doi.org/10.1038/srep18140>

Souza, M. P. De, Bjerk, T. R., Gressler, P. D., Cassia, R. De, Schneider, D. S., Corbellini, A., ... Moraes, A. (2012). As Microalgas Como Uma Alternativa Para a Produção De Biocombustíveis Parte I : Bioetanol. *Tecno-Lógica*, 16(2), 108–116.

Tan, X. B., Lam, M. K., Uemura, Y., Lim, J. W., Wong, C. Y., Ramli, A., ... Lee, K. T. (2018). Semi-continuous cultivation of *Chlorella vulgaris* using chicken compost as nutrients source: Growth optimization study and fatty acid composition analysis. *Energy Conversion and Management*, 164(November 2017), 363–373. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2018.03.020>

Vankelecom, I. F. J. (2014). Bioresource Technology Membrane photobioreactors for integrated microalgae cultivation and nutrient remediation of membrane bioreactors effluent. *BIORESOURCE TECHNOLOGY*, 163, 228–235. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.04.012>

Wang, L., Li, Y., Chen, P., Min, M., Chen, Y., Zhu, J., & Ruan, R. R. (2010). Bioresource Technology Anaerobic digested dairy manure as a nutrient supplement for cultivation of oil-rich green microalgae *Chlorella*

sp . *Bioresource Technology*, 101(8), 2623–2628. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.10.062>

Zhu, L. D., & Hiltunen, E. (2016). Application of livestock waste compost to cultivate microalgae for bioproducts production: A feasible framework. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 54, 1285–1290. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.10.093>

Znad, H., Al Ketife, A. M. D., Judd, S., AlMomani, F., & Vuthaluru, H. B. (2018). Bioremediation and nutrient removal from wastewater by *Chlorella vulgaris*. *Ecological Engineering*, 110(September 2016), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2017.10.008>

# Anexos 1

**Tabela 37**-Resultados obtidos nos diferentes ensaios realizados ao longo do presente estudo

Resíduo	Meio	Regime	Taxas de Remoção (%)				Produção (g/L)	Produtividade (g/L/dia)
			Fósforo	Azoto	CQO	CBO <sub>5</sub>		
F.O. RSU	D.Total	Descontínuo	-	28,2	-	100	103 *	1,91 *
	D.Parcial		49,2	56,9	43,1	99	98,4 *	1,82 *
	Borbulhado estrume- Controlo Positivo		71,2	85,7	61,0	99,4	85,6 *	1,58 *
Estrume de bovino	18		-	-	-	-	2,13	0,08
	22		-	-	-	-	2,8	0,1
Efluente de Aviário	Bruto		-	-	-	-	2,32	-
	Filtrado (200 mL)	Semi-Contínuo	37,5-84,5		25-89,3	-	1,06	-
	Tratado (150 mL)		65,9	33,3	20	-	1,72-2,07	-
	Filtrado (150 mL)		95,8	14,3-33,3	-	-	1,79-2,15	-
	Tratado (75 mL)		-	-	67	-	0,71-1,67	-
	Filtrado (75 mL)		-	16,7	25	-	0,57-1,31	-

\* Valores afetados pela morte da cultura de microalgas nos reatores

